

**Genombasierte und funktionelle Analysen  
von Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL)- und AmpC-bildenden  
*Escherichia coli* Isolaten verschiedener Herkunft**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer.nat)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Michael Pietsch  
aus Düsseldorf

1. Referent: Professor Dr. Michael Steinert  
2. Referent: apl. Professor Dr. Guido Werner  
eingereicht am: 23.07.2018  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 18.02.2019

Druckjahr 2019

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

**Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Michael Brenner, G., Hamprecht, A., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Kreienbrock, L., Pfeifer, Y., Fuchs, S., Werner, G., RESET Study Group.** Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. BMC Genomics: 19(1):601 (2018)

**Roschanski, N., Fischer, J., Falgenhauer, L., Pietsch, M., Guenther, S., Kreienbrock, L., Chakraborty, T., Pfeifer, Y., Guerra, B., Roesler, U.** Retrospective analysis of bacterial cultures sampled in German chicken-fattening farms during the years 2011-2012 revealed additional VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and a serologically rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. Frontiers in Microbiology: 9:538 (2018)

**Pietsch, M., Eller, C., Wendt, C., Holfelder, M., Falgenhauer, L., Fruth, A., Grössl, T., Leistner, R., Valenza, G., Werner, G., Pfeifer, Y., RESET Study Group.** Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. Veterinary Microbiology: 200:130-137 (2017)

**Valenza, G., Nickel, S., Pfeifer, Y., Pietsch, M., Voigtländer, E., Lehner-Reindl, V., Höller, C.** Prevalence and Genetic Diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in nursing homes in Bavaria, Germany. Veterinary Microbiology: 200:138-141 (2017)

**Falgenhauer, L., Imirzalioglu, C., Ghosh, H., Gwozdzinski, K., Schmiedel, J., Gentil, K., Bauernfeind, R., Kämpfer, P., Seifert, H., Michael, G.B., Schwarz, S., Pfeifer, Y., Pietsch, M., Roesler, U., Guerra, B., Fischer, J., Sharp, H., Käsbohrer, A., Goesmann, A., Hille, K., Kreienbrock, L., Chakraborty, T.** Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. International Journal of Antimicrobial Agents: 47(6):457-65 (2016)

## Tagungsbeiträge

**Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Pfeifer, Y., Werner, G.** NGS-based analysis of AmpC-beta-lactamase CMY-2-producing *Escherichia coli* from humans, livestock and food in Germany. 7<sup>th</sup> Symposium in Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Braunschweig. (2017)

## Posterbeiträge

**Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Pfeifer, Y., Werner, G.** NGS-based analysis of AmpC-beta-lactamase CMY-2-producing *Escherichia coli* from humans, livestock and food in Germany. Poster P1103. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Wien. (2017)

**Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Pfeifer, Y., Werner, G.** Comparisons of AmpC-beta-lactamase CMY-2 encoding plasmids from *Escherichia coli* from humans, livestock and food in Germany. Poster A16. National Symposium on Zoonoses Research 2017, Berlin. (2017)

**Pietsch, M., Eller, C., Falgenhauer, L., Leistner, R., Valenza, G., Wendt, C., Werner, G., Pfeifer, Y.** Comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals, ambulatory settings and the community. Poster PO17. 11<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM XI). Estoril. (2016)

**Pietsch, M., Pfeifer, Y., Werner, G.** Investigations on bacterial fitness of *Escherichia coli* with plasmid mediated beta-lactam resistance. Poster PO32. 11<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM XI). Estoril. (2016)

## Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation .....	i
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	ix
Abbildungsverzeichnis .....	xi
Tabellenverzeichnis .....	xiii
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Antibiotika .....	1
1.1.1 $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	2
1.1.2 $\beta$ -Laktam-Resistenz .....	4
1.1.2.1 $\beta$ -Laktamasen .....	6
1.1.2.2 Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen .....	6
1.1.2.3 $\beta$ -Laktamasen und „Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBLs)“ .....	6
1.1.2.3.1 TEM .....	7
1.1.2.3.2 SHV .....	7
1.1.2.3.3 CTX-M .....	7
1.1.2.3.4 AmpC .....	8
1.1.2.3.5 Carbapenemasen .....	9
1.2 Mobile genetische Elemente .....	10
1.2.1 IS Elemente .....	10
1.2.2 Plasmide .....	10
1.3 Spezies <i>E. coli</i> .....	11
1.3.1 <i>E. coli</i> Phylogenie .....	12
1.3.2 Ganzgenombasierte phylogenetische Analysen .....	13
1.3.2.1 <i>E. coli</i> ST131 .....	15
1.3.3 Transmission von ESBL/AmpC-bildenden <i>E. coli</i> und zoonotisches Potential .....	17
1.4 Resistenz und bakterielle Fitness .....	19
1.5 Zielstellung dieser Arbeit .....	21
1.5.1 ESBL <i>E. coli</i> Populationsstudie .....	21
1.5.2 CMY-2 Studie .....	21
1.5.3 Fitness Studie .....	22
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Materialien .....	25
2.1.1 Geräte .....	25

2.1.2 Chemikalien.....	26
2.1.3 Enzyme .....	26
2.1.4 Chemotherapeutika .....	27
2.1.5 Kits.....	27
2.1.6 Medien und Lösungen.....	28
2.1.7 PCR-Primer .....	28
2.1.8 Software und Skripte.....	29
2.1.9 Sequenziertechnologien und -plattformen.....	30
2.1.10 Bakterienisolate .....	31
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Übernachtkultur und Bakterienkultivierung .....	33
2.2.1.2 Kryokonservierung .....	33
2.2.1.3 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung .....	33
2.2.1.4 Konjugationsexperimente .....	33
2.2.1.4.1 Molekularbiologische Überprüfung und Typisierung der Transkonjuganten .....	34
2.2.1.5 Wachstumsversuche mit Transkonjuganten und Auswertung („Fitness Studie“) .....	34
2.2.1.5.1 Wachstumsversuche in Mikrowellplatten .....	34
2.2.1.5.2 Wachstumsversuche in Schüttelkultur .....	35
2.2.1.5.3 Langzeitwachstumsversuche.....	35
2.2.1.5.4 Auswertung der Wachstumsexperimente .....	36
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.2.1 Extraktion von DNA .....	37
2.2.2.1.1 - für PCR-Anwendungen.....	37
2.2.2.1.2 - für Ganzgenomsequenzierungen.....	37
2.2.2.1.3 - plasmidischer DNA .....	37
2.2.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	38
2.2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	39
2.2.2.3.1 Bestimmung der phylogenetischen Gruppen von <i>E. coli</i> .....	40
2.2.2.3.2 Multi-Lokus-Sequenztypisierung (MLST).....	40
2.2.2.3.3 Plasmid-Replikontypisierung (PRBT) .....	41
2.2.3 Sequenziermethoden.....	41
2.2.3.1 Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung).....	41
2.2.3.1.1 Probenvorbereitung zur Produktsequenzierung (Sanger) .....	41
2.2.3.2 Illumina Ganzgenomsequenzierung .....	42

2.2.3.2.1	MiSeq <i>Library</i> -Erstellung und Sequenzierung.....	43
2.2.3.3	SMRT Sequencing (PacBio).....	43
2.2.4	Bioinformatische Prozesse.....	45
2.2.4.1	Read Qualitätskontrolle .....	45
2.2.4.2	<i>De novo</i> Assemblierung.....	45
2.2.4.3	Read Mapping und SNP Identifizierung .....	45
2.2.4.4	Berechnung und Visualisierung phylogenetischer Bäume.....	46
2.2.4.5	Genotypisierung anhand von Ganzgenomdaten .....	46
2.2.4.5.1	ResFinder 3.0.....	47
2.2.4.5.2	MLST 1.8.....	47
2.2.4.5.3	PlasmidFinder 1.3 und pMLST 1.4.....	47
2.2.4.5.4	VirulenzFinder 1.5 .....	47
2.2.4.5.5	ST131 Typisierung anhand von <i>fimH</i> , <i>gyrA</i> und <i>parC</i> .....	47
2.2.4.6	cgMLST (SeqSphere+).....	48
2.2.4.7	Plasmidrekonstruktion CMY-2 Studie .....	49
2.2.4.8	IncK Plasmidvergleiche.....	51
2.2.4.9	Sequenzrekonstruktion der Referenzsequenzen 102/04 K1 und K2 (Fitness-Studie) ..	52
2.2.4.10	Ganzgenomvergleiche (Fitness-Studie).....	52
3	Ergebnisse .....	55
3.1	ESBL <i>E. coli</i> Populationsstudie - Untersuchung der Populationsstruktur humaner ESBL- <i>E. coli</i> Isolate aus unterschiedlichen Quellen anhand der Sequenztypen .....	55
3.1.1	Studie RKI-Laborverbund Limbach.....	56
3.1.2	Fall-Kontroll-Studie (Charité) .....	57
3.1.3	Besiedlungsstudie Allgemeinbevölkerung .....	58
3.1.4	Analyse der ST131 Isolate .....	58
3.1.5	Nachweis weiterer Resistenzgene .....	59
3.2	CMY-2 Studie - Vergleich von <i>E. coli</i> Isolaten mit AmpC (CMY-2)-Bildung von Mensch, Tier und Tierprodukt .....	60
3.2.1.1	Isolatauswahl und Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit.....	60
3.2.1.2	Resistenzgennachweis .....	60
3.2.1.3	Populationsuntersuchungen .....	61
3.2.1.3.1	Detaillierte SNP-basierte Cluster Analysen.....	65
3.2.1.3.1.1	ST117/ST3778 Isolate .....	65
3.2.1.3.1.2	ST131 Isolate .....	67
3.2.1.3.1.3	ST1196 Isolate .....	68

3.2.1.3.1.4	ST429 Isolate .....	70
3.2.1.3.1.5	ST1463 Isolate .....	71
3.2.1.4	Charakterisierung der <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> tragenden Plasmide und der genetischen Umgebung von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	71
3.2.1.4.1	Identifizierung des genetischen Hintergrundes von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> und der direkten genetischen Umgebung von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	71
3.2.1.4.2	IncK Plasmide .....	73
3.2.1.4.3	IncI1 .....	77
3.2.1.4.4	IncA/C .....	79
3.2.1.4.5	Chromosomale und vermutet chromosomale <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> Integration .....	80
3.2.1.5	Analyse der Populationsstruktur von ST131- <i>E. coli</i> Isolaten .....	81
3.2.1.6	Vergleich von IncK2 Plasmiden verschiedener Herkunft .....	84
3.2.1.7	ST429 Analyse .....	85
3.3	Fitness Studie - Experimentelle Untersuchungen zur bakteriellen Fitness nach Erwerb von ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-Gen-tragenden Plasmiden und Analyse möglicher Ursachen der Fitnesskompensation .....	87
3.3.1	Konjugation und Transkonjuganten .....	87
3.3.2	Wachstumsvergleiche der Transkonjuganten .....	87
3.3.3	Transferexperimente .....	90
3.3.3.1	RS165 K1 .....	91
3.3.3.2	102/04 K1 und 102/04 K2 .....	92
3.3.3.3	Fitnessstrend und weitere Beobachtungen .....	95
3.3.4	Genomvergleiche .....	97
3.3.4.1	<i>De novo</i> Sequenzierung ausgewählter Transkonjuganten .....	97
3.3.4.2	Ganzgenomvergleiche der Transkonjuganten .....	98
4	Diskussion .....	103
4.1	„ESBL <i>E. coli</i> Populationsstudie“ - Populationsuntersuchung von ESBL <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborverbund Studie, der Studie „Allgemeinbevölkerung“ und Fall-Kontroll Studie (Charité) .....	103
4.1.1	ST131 .....	103
4.1.2	ST410, ST10, ST38 und ST69 .....	106
4.1.3	Fazit .....	108
4.2	CMY-2 Studie .....	109
4.2.1	Untersuchung der Populationsstruktur von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> tragenden <i>E. coli</i> .....	109
4.2.1.1	ST131 .....	112
4.2.2	Lokalisation von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	113
4.2.2.1	IncK Plasmide .....	114



---

4.2.2.2 Incl1 Plasmide .....	115
4.2.2.3 Chromosomale Lokalisierung .....	117
4.2.2.4 Direkte genetische Umgebung von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	117
4.2.3 Beobachtungen zu Resistenz und Virulenz .....	118
4.2.4 Limitationen .....	120
4.2.5 Fazit .....	121
4.3 Fitness Studie .....	122
4.3.1 Initialer Fitnessverlust .....	122
4.3.2 Genomvergleiche .....	123
4.3.2.1 IS10 .....	124
4.3.3 Langzeitkultivierung .....	126
4.3.4 Fazit, Limitationen und Ausblick .....	127
5 Zusammenfassung .....	129
6 Summary .....	131
7 Literaturverzeichnis .....	133
8 Anhang .....	xv
Anhang I: ESBL <i>E. coli</i> Populationsstudie .....	xv
Anhang II: CMY-2 Studie .....	xx
Anhang III: Fitness Studie .....	xxxix
9 Danksagung .....	xxxv



**Abkürzungsverzeichnis**

μ	Wachstumsrate
AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	Brain-Heart-Infusion
<i>bla</i>	β-Laktamasegen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CAZ	Ceftazidim
CGE	Center for Genomic Epidemiology
cgMLST	core genome Multilocus Sequence Typing
CIP	Ciprofloxacin
CMP	Chloamphenicol
CTM	Cefotiam
CTX	Cefotaxim
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended Spectrum β-Laktamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLI	Friedrich Löffler-Institut
FOX	Cefoxitin
FU	Freie Universität Berlin
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GCG	Gallsäure-Chrysoidin-Glycerol
GEN	Gentamicin
HGT	horizontaler Gentransfer
IMP	Imipenem
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IR	Inverted repeats
IS	Insertionssequenz
JLU	Justus Liebig Universität Gießen
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Mb	Megabasenpaare
MEP	Meropenem
MEZ	Mezlocillin
MGE	Mobiles genetisches Element
MH	Müller-Hinton

MHK	Minimale Hemm-Konzentration
ML	Maximum-Likelihood
MLEE	Multilocus Enzyme Elektrophoresis
MLST	Multilocus Sequence Typing
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MST	Minimum Spanning Tree
MSU	Mezlocillin/Sulbactam
NAL	Nalidixinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD <sub>nm</sub>	Optische Dichte
OMP	Outer Membrane Proteine
ORF	Open Reading Frame
OTE	Oxytetracyclin
PBP	Pencillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pMLST	Plasmid Multilocus Sequence Typing
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
PRBT	PCR-based Replicon Typing
RESET	ESBL and (fluoro)quinolone <u>Resistance</u> in <u>Enterobacteriaceae</u>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SMRT	Single Molecule Realtime
SMZ	Sulfamerazin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequenztyp
STR	Streptomycin
SXT	Sulfmethixazol/Trimethoprim
T <sub>A</sub>	Annealing-Temperatur
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tn	Transposon
üN	über Nacht
wgMLST	whole genome Multilocus Sequence Typing
Δ	delta

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung verschiedener Wirkungsmechanismen von ausgewählten antibiotischen Substanzen .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Repräsentative Strukturen von $\beta$ -Laktam-Antibiotika und $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren.....	3
<b>Abbildung 3:</b> Anteil (%) von <i>E. coli</i> mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Europa. ....	4
<b>Abbildung 4:</b> Entwicklung der Cefotaxim-Resistenz bei <i>E. coli</i> vom Menschen, aufgeteilt nach Versorgungsbereich und Stationstyp. ....	5
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der 7 MLST Allele (rot) aus dem Warwick Schema auf dem <i>E. coli</i> Chromosom. ....	13
<b>Abbildung 6:</b> Gegenüberstellung verschiedener phylogenetischer Analysemethoden und ihrer Auflösungsvermögen.....	15
<b>Abbildung 7:</b> Darstellung der <i>E. coli</i> ST131 Phylogeniestructur, adaptiert nach Mathers <i>et al.</i> (46).....	16
<b>Abbildung 8:</b> Auswirkung eines Plasmiderwerbs auf die Fitness eines Bakteriums und mögliche kompensatorische Effekte.....	20
<b>Abbildung 9:</b> Arbeitsschema der Fitnessuntersuchungen.....	23
<b>Abbildung 10:</b> Ablaufschema für die Identifizierung von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> Plasmiden. ....	51
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich des Auflösungsvermögens von MLST vs cgMLST anhand der ST131 Klade. ....	63
<b>Abbildung 12:</b> Phylogenetischer Baum von 164 CMY-2-produzierenden <i>E. coli</i> Isolat. ....	64
<b>Abbildung 13:</b> Maximum-Likelihood Baum von ST117/ST3778 Isolat. ....	67
<b>Abbildung 14:</b> Maximum-Likelihood Baum von ST131 Isolat. ....	68
<b>Abbildung 15:</b> Maximum-Likelihood Baum (MLT) basierend auf allen ST1196 Isolat. ....	69
<b>Abbildung 16:</b> Maximum-Likelihood Baum von ST429 Isolat. ....	70
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der Plasmidsequenzen von p468-16 mit den zuvor beschriebenen IncK2 Plasmiden mit <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> pTMSA1088 und pDV45. ....	74
<b>Abbildung 18:</b> Direkte genetische Umgebung von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> der Studienisolate. ....	78
<b>Abbildung 19:</b> Populationsstruktur von <i>E. coli</i> ST131.....	82
<b>Abbildung 20:</b> Ausschnitt aus der Populationsstrukturanalyse von <i>E. coli</i> ST131 in Klade B2 und B3.....	83
<b>Abbildung 21:</b> Minimum-Spanning-Tree der <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> -IncK2-Plasmide. ....	84
<b>Abbildung 22:</b> Neighbour-Joining-Tree aller verfügbaren <i>E. coli</i> ST429 Isolate. ....	86
<b>Abbildung 23:</b> Relative Wachstumsraten der Transkonjuganten gegenüber dem plasmidfreien Rezipienten <i>E. coli</i> K12 J53. ....	88
<b>Abbildung 24:</b> Kombinierte Wachstumskurven ausgewählter Transkonjuganten im Vergleich zum plasmidfreien Rezipienten <i>E. coli</i> K12 J53. ....	89
<b>Abbildung 25:</b> Relative Wachstumsraten der Transkonjuganten gegenüber dem plasmidfreien Rezipienten <i>E. coli</i> K12 J53. ....	90
<b>Abbildung 26:</b> Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von RS165 K1 .....	91
<b>Abbildung 27:</b> Überlagerte Wachstumskurven ausgewählter RS165 K1 Transkonjuganten verschiedener Generationen. ....	92
<b>Abbildung 28:</b> Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von 102/04 K1.....	93
<b>Abbildung 29:</b> Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von 102/04 K2.....	93

<b>Abbildung 30:</b> Überlagerte Wachstumskurven ausgewählter 102/04 K1 und K2 Transkonjuganten verschiedener Generationen.....	94
<b>Abbildung 31:</b> Fitnesstrend der einzelnen Transkonjuganten über 500 Generationen. ....	95
<b>Abbildung 32:</b> Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen der Transkonjuganten 102/04 K1 und K2 nach Langzeitkultivierung. ....	99
<b>Abbildung 33:</b> Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen der Transkonjugante RS165 K1 nach Langzeitkultivierung.....	101
<b>Abbildung 34:</b> Verteilung der Sequenztypen bei ESBL-bildenden <i>E. coli</i> aus verschiedenen Studien....	104
<b>Abbildung 35:</b> Schematische Abbildung der IncI1 Plasmide.....	116
<b>Abbildung 36:</b> Schematische Darstellung einer möglichen Populationsentwicklung von RS165K1 über den Verlauf der Langzeitkultivierung. ....	126

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Klassifizierungsschema für $\beta$ -Laktamasen, modifiziert nach Bush und Jakoby (18) .....	6
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Geräte .....	25
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Chemikalien .....	26
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Enzyme .....	26
<b>Tabelle 5:</b> In MHK-Mikroboullion verwendete Chemotherapeutika .....	27
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Kits .....	27
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Nährmedien und Lösungen .....	28
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete PCR-Primerpaare. ....	28
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Software und Onlinetools.....	29
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Sequenziertechnologien.....	30
<b>Tabelle 11:</b> Standard PCR-Ansatz .....	40
<b>Tabelle 12:</b> Standard PCR-Bedingungen .....	40
<b>Tabelle 13:</b> Referenzsequenzen für <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> tragende Plasmide und chromosomalen Hintergrund .....	50
<b>Tabelle 14:</b> Identifizierte Sequenztypen von ESBL- <i>E. coli</i> aus unterschiedlichen Studien.....	57
<b>Tabelle 15:</b> Zuordnung der ESBL-ST131-Isolate zu den jeweiligen ST131-Kladen .....	59
<b>Tabelle 16:</b> Übersicht über die Sequenztypen und ST131 Raten von <i>E. coli</i> Isolaten mit CMY-2-Bildung isoliert von Mensch, Tier und Tierprodukt.....	62
<b>Tabelle 17:</b> <i>E. coli</i> Isolate der Sequenztypen ST117/3778 .....	66
<b>Tabelle 18:</b> <i>E. coli</i> Isolate des Sequenztyps ST131 .....	68
<b>Tabelle 19:</b> <i>E. coli</i> Isolate des Sequenztyps ST1196 .....	69
<b>Tabelle 20:</b> <i>E. coli</i> Isolate des Sequenztyps ST429 .....	70
<b>Tabelle 21:</b> Übersicht des genetischen Kontexts von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> zwischen und innerhalb der unterschiedlichen Reservoirs .....	72
<b>Tabelle 22:</b> Übersicht über <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> tragende IncK Plasmide in 76 <i>E. coli</i> Isolaten .....	75
<b>Tabelle 23:</b> Insertionselemente und jeweilige Position in den <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> tragenden Plasmiden .....	76
<b>Tabelle 24:</b> Übersicht über IncI1 Plasmide.....	77
<b>Tabelle 25:</b> Aufteilung der chromosomalen Integration von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> in gesicherte und einzigartig auftretende chromosomale Positionen und in die putativ chromosomalen TN44889-identischen Fragmente .....	81
<b>Tabelle 26:</b> Hergestellten Transkonjuganten mit jeweiligem $\beta$ -Laktamasegen, Plasmidtyp und Plasmidgröße, sowie der Spezies des Donorstamms. ....	87
<b>Tabelle 27:</b> Fitnesswerte der langzeitkultivierten Transkonjuganten. ....	96
<b>Tabelle 28:</b> Isolate mit durchgeführter Ganzgenomsequenzierung und eingesetzte Technologie .....	97
<b>Tabelle 29:</b> Ergebnisse der <i>de novo</i> -Sequenzierung und Assemblierung der Reads der Isolate 102/04 K1 und K2G <sub>0</sub> .....	97
<b>Tabelle 30:</b> Ergebnisse des Mappings der Reads der verschiedenen RS165K1 Isolate auf die Referenzsequenz 102/04 K1 G <sub>0</sub> .....	98





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Antibiotika

Als Antibiotika gelten Stoffwechselprodukte von Bakterien oder Pilzen, und im weiteren Sinne auch teil- oder vollsynthetische antimikrobielle Substanzen, welche das Wachstum von Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten (1). Antimikrobielle Substanzen können in bakteriostatische (Zellwachstum inhibierende) und bakterizide (Zelltod induzierende) Wirkstoffe unterteilt werden und lassen sich zudem je nach Wirkmechanismus oder Angriffsort in verschiedene Gruppen unterteilen. Wichtige Angriffsorte von Antibiotika sind beispielsweise die Nukleinsäuresynthese (Chinolone), die ribosomale Proteinbiosynthese (Tetracycline und Aminoglykoside), die Cytoplasmamembran (Polymyxine und Daptomycin) und die Zellwand ( $\beta$ -Laktame) (**Abbildung 1**).

Eine Gruppe von Antibiotika, die auf die Nukleinsäuresynthese einwirken, sind Chinolone und Fluorchinolone, eine Untergruppe der Chinolone. Chinolone wirken antibakteriell, indem sie die DNA-Gyrase oder Topoisomerase IV inhibieren und damit die DNA-Replikation und Transkription hemmen (2). Vertreter der ersten Generation der Chinolone ist, wenn auch eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Diazanaphthaline, Nalidixinsäure, welche in den 1960er Jahren erstmals zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt wurde (2). Anhand ihres antibakteriellen Spektrums lassen sich Chinolone in vier Generationen einteilen (3). Die heutzutage gebräuchlichsten Chinolone stammen aus der Zweit-, Dritt- und Viertgeneration, wie z.B. Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin (4).

Antibiotika, die eine Hemmung der Proteinbiosynthese verursachen, inhibieren entweder die 50S oder 30S Untereinheit der Ribosomen und können entsprechend ihres Angriffsortes unterteilt werden. Proteinbiosynthesehemmer, welche an den 50S Ribosomen wirken, sind beispielsweise Makrolide (z.B. Erythromycin), Oxazolidinone (z.B. Linezolid) oder Phenicole (z.B. Cloramphenicol) (5). Durch Bindung an das Peptidyltransferase-Zentrum der 50S Untereinheit des Ribosoms wird die Verknüpfung von Peptidbindungen und damit die Proteinelongation verhindert (4). Bei Tetracyclinen und Aminoglykosiden handelt es sich dagegen um 30S Inhibitoren. Tetracycline (z.B. Doxycyclin oder Minocyclin) inhibieren, indem sie den Zugang von Aminoacyl-tRNAs zum Ribosom blockieren (4). Aminoglykoside dagegen binden an die 16S rRNA der 30S Untereinheit der Ribosomen und verursachen dort Fehlablesungen der mRNA. Dies führt zur Produktion fehlerhafter Proteine und zum Tod des Bakteriums (4). Wichtige Vertreter der Aminoglykoside sind beispielsweise Gentamicin und Amikacin (5). Die Integrität der Zellmembran kann durch Polymyxine oder Daptomycin beeinflusst werden und somit bakterizide Wirkung haben. Polymyxine (Polymyxin B oder Colistin) sind zyklische Polypeptidantibiotika, die sich in die Membran einlagern und deren Permeabilität stören (5). Daptomycin führt durch

Membraneinlagerung zur Ausbildung von Membranporen und damit einer Depolarisation des Membranpotentials (5). Der bakterizide Effekt von Daptomycin wird zusätzlich durch eine Hemmung der Zellwand-Synthese verstärkt (6).

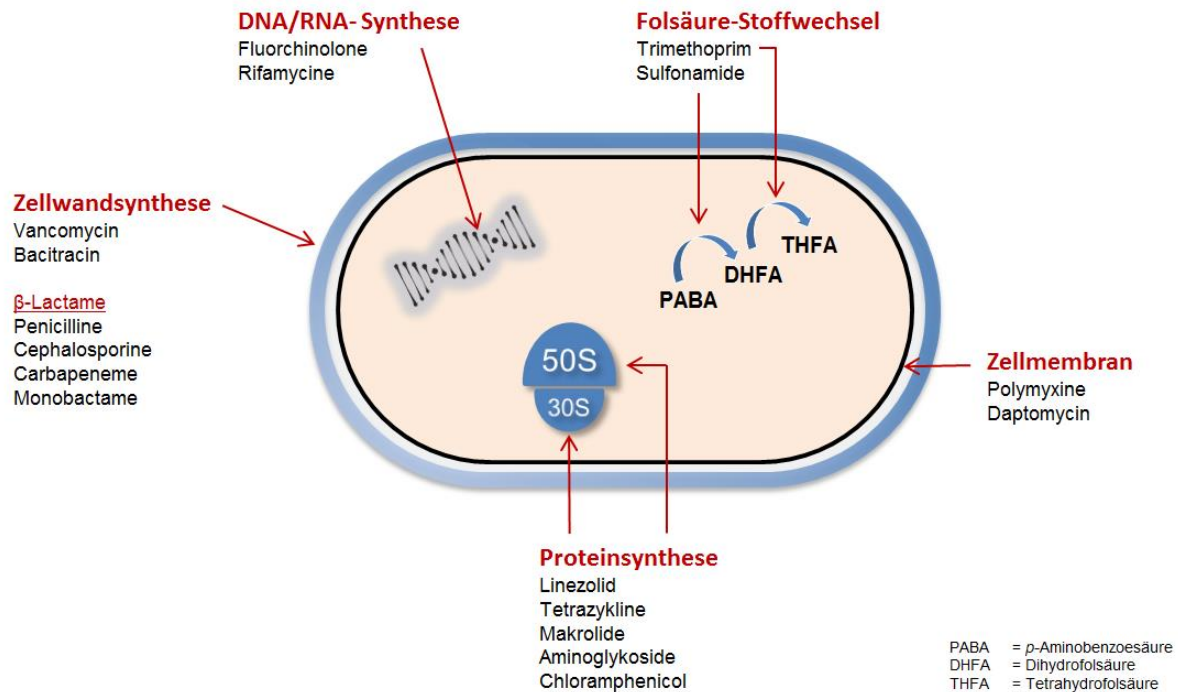


Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Wirkungsmechanismen von ausgewählten antibiotischen Substanzen

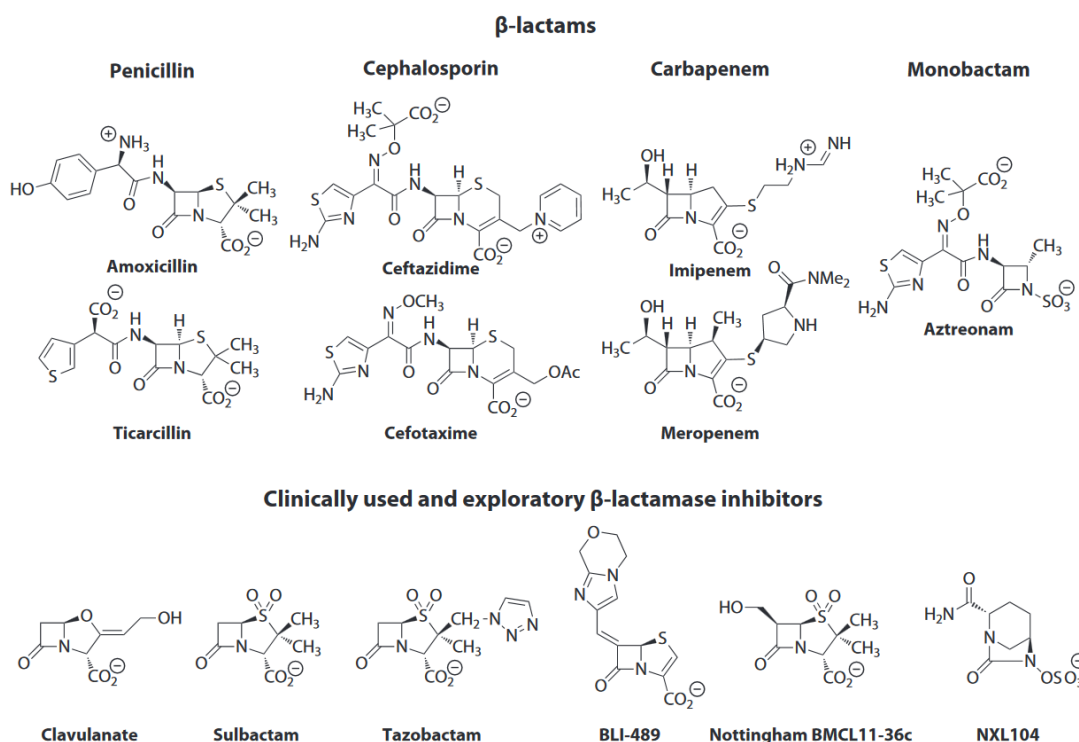
### 1.1.1 $\beta$ -Laktam-Antibiotika

In der Human- und Veterinärmedizin gehören  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu der am häufigsten eingesetzten Substanzgruppe. Diese werden anhand ihrer Molekülkomponenten in vier Untergruppen eingeteilt: Die Penicilline, die Cephalosporine, die Carbapeneme und die Monobactame. In allen vier Gruppen ist der namensgebende  $\beta$ -Laktamring das antimikrobiell aktive Zentrum (7). Penicilline und Carbapeneme verfügen zusätzlich über einen fünfgliedrigen Thiazolidinring und Cephalosporine über einen sechsgliedrigen Thiazinring (**Abbildung 2**).  $\beta$ -Laktam-Antibiotika erzielen ihre antimikrobielle Wirkung durch die Hemmung der Peptidoglykansynthese und wirken nur auf proliferierende Zellen bakterizid. Speziell hemmen sie die Aktivität der Transpeptidasen (auch Penicillin-Binding-Protein (PBP) genannt), welche für die Quervernetzung des Mureins verantwortlich sind. Die Wirksamkeit beruht auf der Strukturanalogie der  $\beta$ -Lactame mit dem Substrat der Transpeptidasen, Acyl-D-Alanyl-D-Alanin. Dies ermöglicht eine irreversible Inaktivierung der PBPs.

Das erste therapeutisch eingesetzte  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum war Penicillin G und lässt sich den Benzylpenicillinen zuordnen. Die Gruppe der Penicilline umfasst weiterhin die Penicillinderivate

Aminopenicilline (z.B. Ampicillin und Amoxycillin), Acylaminopenicilline (z.B. Piperacillin und Mezlocillin) und Isoxazolympenicilline (z.B. Oxacillin). Diese zeichnen sich durch ein erweitertes Wirkungsspektrum aus (5).

Cephalosporine werden pharmakologisch in verschiedene Generationen unterteilt. Zu den Cephalosporinen der 1. Generation gehören die Wirkstoffe Cefalotin, Cefalexin, Cefazolin und Cefadroxil. Cephalosporine der 2. Generation sind z.B. Cefalozin, Cefuroxim und Cefoxitin. Zur 3. Generation gehören beispielsweise Ceftiofur, Ceftriaxon, Cefotaxim und Ceftazidim. Diese Generation deckt ein breites Spektrum Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien ab und Cephalosporine der 4. Generation (z.B. Cefepim) sind deutlich stabiler gegenüber bakteriellen Resistenzmechanismen, wie der  $\beta$ -Laktamase-Bildung.



**Abbildung 2: Repräsentative Strukturen von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren** (Bush, K. und Fisher, J.F. 2011 (8))

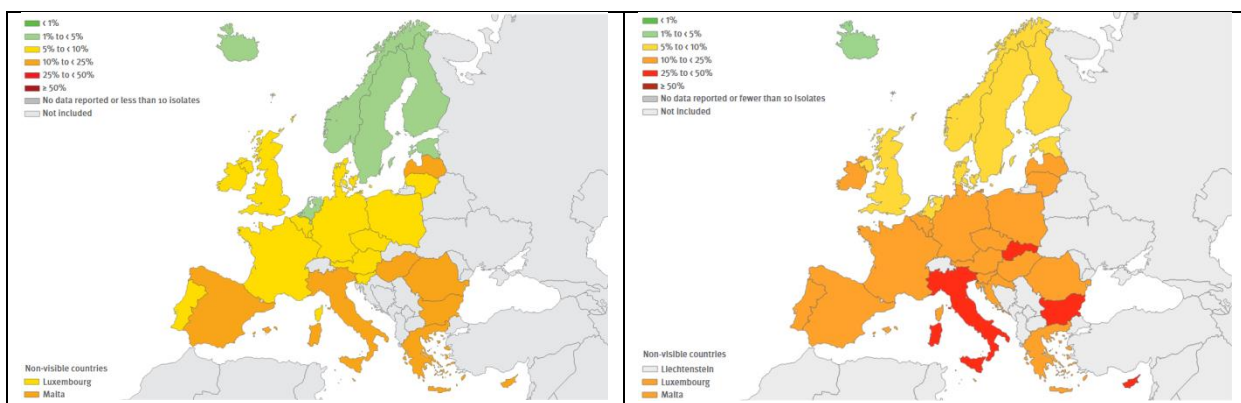
Carbapeneme besitzen von allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika das breiteste Wirkspektrum gegen fast alle Gram-positiven und Gram-negativen Erreger und gelten als Reserveantibiotika (5). Vertreter der Carbapeneme sind Imipenem, Ertapenem und Meropenem.

Im Gegensatz zu den anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika liegt bei den Monobactamen der  $\beta$ -Laktam Ring nicht fusioniert vor. Monobactame wirken nur gegen aerobe Gram-negative Bakterien. Wichtigster Vertreter ist Aztreonam (9).

Eine ähnliche Grundstruktur wie  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, aber keine antibiotische Wirkung, besitzen  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, wie z.B. Clavulanat und Sulbactam (**Abbildung 2**). Aufgrund ihrer Eigenschaft, bestimmte  $\beta$ -Laktamasen irreversibel zu binden und damit zu inhibieren, werden sie sowohl therapeutisch als auch in der Diagnostik eingesetzt (10).

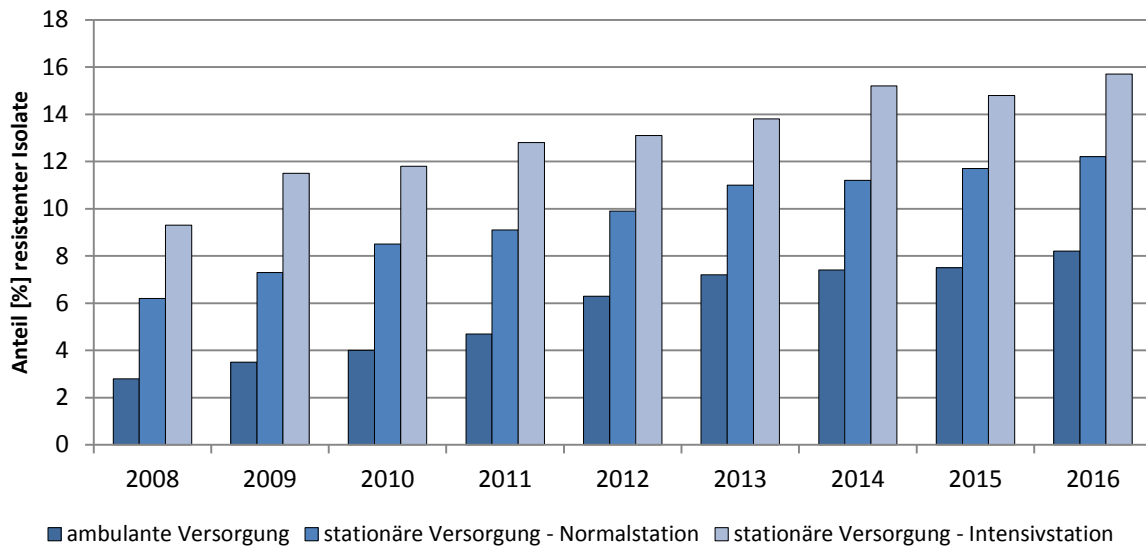
### 1.1.2 $\beta$ -Laktam-Resistenz

In den vergangenen Jahren wurde weltweit eine dramatische Zunahme Gram-negativer Infektionserreger mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation beobachtet (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3: Anteil (%) von *E. coli* mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Europa.** Links: 2011; rechts: 2015, EU/EEA, Quelle: EARS-Net-Datenbank, [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)

Auch in Deutschland ließen sich steigende Resistenzraten bei *Escherichia (E.) coli* und *Klebsiella* spp. nachweisen. Je nach Untersuchungsort ergeben sich verschiedene Resistenzraten; der höchste Anteil Cefotaxim-resistenter *E. coli* wurde im Jahr 2016 auf deutschen Intensivstationen nachgewiesen (15,7 %), gefolgt von *E. coli* von Normalstationen (12,2 %) und der ambulanten Versorgung (8,2 %) (**Abbildung 4**). Neben den hohen Prävalenzen bei Patienten im Gesundheitssystem wurde auch bei gesunden Menschen in der Allgemeinbevölkerung eine intestinale Kolonisation mit Cefotaxim-resistenten-*E. coli* von 6,3 % nachgewiesen (11).



**Abbildung 4: Entwicklung der Cefotaxim-Resistenz bei *E. coli* vom Menschen, aufgeteilt nach Versorgungsbereich und Stationstyp.** Datenquelle: Robert Koch-Institut, ARS, <http://ars.rki.de>, abgerufen am 07.03.2018

Die Ursachen für die Drittgenerations-Cephalosporinresistenz bei Gram-negativen Bakterien können durch natürliche/intrinsische Resistenz, durch Mutationen in chromosomalen Genen oder durch den Erwerb von Resistenzgenen (horizontaler Gentransfer) bedingt sein. Eine natürliche/intrinsische Resistenz ist beispielsweise durch das Fehlen von geeigneten Zielstrukturen für diese Antibiotika bedingt. Es gibt drei wichtige Mechanismen die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika vermitteln:

- i. **Modifikationen der Penicillin-bindenden Proteine (PBP)**
- ii. **Strukturelle Veränderungen der Zelloberfläche**
- iii. **Die Bildung und Freisetzung von  $\beta$ -Laktamasen**

Die Modifikation des Angriffspunkts (PBPs) (i) der  $\beta$ -Laktam Antibiotika wird durch chromosomale Veränderungen erreicht. Dies führt zu einer geringeren Bindungsaffinität der  $\beta$ -Laktame gegenüber den PBPs und ist häufiger Resistenzmechanismus bei Gram-positiven Bakterien (12). Eine weitere Möglichkeit einer antimikrobiellen Resistenz (ii) kann die verminderte Produktion von Porinen (auch *outer membrane proteins* (OMPs) genannt) oder eine erhöhte Aktivität von Effluxpumpen sein. In bestimmten Fällen kann ein Porinverlust auch zu einer Resistenz gegenüber Carbapenemen führen (13, 14). Häufigste Ursache für eine  $\beta$ -Laktam-Resistenz stellt jedoch die Produktion und Freisetzung von  $\beta$ -Laktamasen dar (15). Viele gramnegative Bakterien besitzen natürlicherweise, chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamasen, welche in der Lage sind Penicilline und einige Cephalosporine durch hydrolytische Ringspaltung zu inaktivieren.

### 1.1.2.1 $\beta$ -Laktamasen

### 1.1.2.2 Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen

Die Vielfalt der entdeckten  $\beta$ -Laktamasen führte Entwicklung von Klassifizierungssystemen für diese. Die heute gebräuchlichsten Schemata sind die Klassifizierung nach Ambler und nach Bush, Jacoby und Medeiros (BJM) (16, 17). Die Klassifizierung nach Ambler erfolgt nach Übereinstimmungen der Aminosäure (AS) -Sequenzen. Es wurden die vier Gruppen A, B, C und D definiert, wobei die Gruppen A, C und D die Serin- $\beta$ -Laktamasen umfassen. Gruppe B beinhaltet die Metallo- $\beta$ -Laktamasen. Als katalytisches Zentrum bei der Hydrolyse des  $\beta$ -Laktam-Rings fungiert bei den Serin- $\beta$ -Laktamasen ein Serylrest und bei den Metallo- $\beta$ -Laktamasen ein Zinkion (17). Die Einteilung der  $\beta$ -Laktamasen im BJM-System erfolgt entsprechend dem Substratspektrum der  $\beta$ -Laktamase und der Hemmbarkeit durch Clavulansäure bzw. Tazobactam und EDTA (**Tabelle 1**) (16, 18).

**Tabelle 1: Klassifizierungsschema für  $\beta$ -Laktamasen, modifiziert nach Bush und Jakoby (18)**

BJM-Gruppe (2010)	Molekulare Gruppe nach Ambler	Substrat	Hemmung durch		Repräsentative Enzyme
			CLV <sup>1</sup> oder TZB <sup>2</sup>	EDTA	
1	C	Cephalosporine	Nein	Nein	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporine	Nein	Nein	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	Ja	Nein	PC1
2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	Ja	Nein	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine, Monobactame	Ja	Nein	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilline	Nein	Nein	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine, Monobactame	Nein	Nein	TEM-50
2c	A	Carbenicillin	Ja	Nein	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbecillin, Cefepim	Ja	Nein	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	Variabel	Nein	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-Spektrum-Cephalosporine	Variabel	Nein	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	Variabel	Nein	OXA-23, OXA-48
2e	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine	Ja	Nein	CepA
2f	A	Carbapeneme	Variabel	Nein	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapeneme	Nein	Ja	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B	Carbapeneme	Nein	Ja	CphA, Sfh-1

<sup>1</sup>CLV, Clavulansäure; <sup>2</sup>TZB, Tazobactam

### 1.1.2.3 $\beta$ -Laktamasen und „Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBLs)“

Nach der Entwicklung der Cephalosporine der dritten Generation in den 1980er Jahren dauerte es nur wenige Jahre bis  $\beta$ -Laktamasen mit Wirkspektrum gegenüber diesen verbesserten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika

beobachtet wurden. Durch Punktmutationen der  $\beta$ -Laktamase-kodierenden Gene kam es zu AS-Substitutionen, welche Veränderungen im aktiven Zentrum der Enzyme bewirkten und so eine Erweiterung des Substratspektrums ermöglichten (19). Diese, als „Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases“ (ESBLs) bezeichneten Enzyme, sind in der Lage, Oxyimino-Cephalosporine (wie z.B. Ceftazidim, Cefotaxim und Cefopodoxim), nicht jedoch Carbapeneme und Cephamycine, zu inaktivieren. ESBLs werden durch  $\beta$ -Laktamase-Hemmer wie Clavulansäure inhibiert (20, 21) und werden den Ambler-Gruppen A und D, bzw. der BJM-Gruppe 2be zugeordnet.

Die wichtigsten  $\beta$ -Laktamasen und ESBLs werden nachfolgend näher erläutert:

#### 1.1.2.3.1 TEM

Die erste nachgewiesene  $\beta$ -Laktamase, TEM-1 (TEM nach dem Namen der griechischen Patientin Temoneira), wurde 1965 in einem *E. coli* Isolat identifiziert und ist nur in der Lage, Penicilline und frühe Cephalosporine zu hydrolysieren (22). TEM-1 ist oftmals Plasmid-vermittelt, häufigster Grund für Ampicillinresistenz und aufgrund von Co-Selektion in den meisten Gram-negativen Spezies zu finden (21, 23). Mit TEM-3 wurde 1984 in Frankreich die erste TEM-Variante mit erweitertem Wirkspektrum, der Hydrolyse der Oxyimino-Cephalosporine, entdeckt (24, 25). Über die folgenden Jahre wurden viele weitere Varianten von TEM nachgewiesen, welche sich in AS-Substitutionen von TEM-1 unterschieden, bzw. nur Nukleotidsubstitutionen aufwiesen (stille Mutationen). Bis heute wurden 214 verschiedene Enzymvarianten von TEM beschrieben, von denen jedoch nicht alle Varianten ein erweitertes Substratspektrum aufweisen (<https://card.mcmaster.ca/ontology/36023>; Abfrage Februar 2018). Einige der Derivate sind dagegen Inhibitor-resistent oder aktiv gegenüber Monobactamen (26).

#### 1.1.2.3.2 SHV

Eine  $\beta$ -Laktamase mit ähnlichem Wirkspektrum wie TEM-1 ist SHV-1 (SHV = sulfhydril variable). Erstmals 1972 nachgewiesen, findet sich diese  $\beta$ -Laktamase häufig chromosomal kodiert bei *Klebsiella* (*K.*) *pneumoniae*, wo vermutlich auch der Ursprung der  $\beta$ -Laktamase liegt (20, 27). Ein Derivat von SHV-1, SHV-2, mit erweitertem Wirkungsspektrum wurde erstmals 1983 in Deutschland in einem *Klebsiella ozeanae* Isolat nachgewiesen (28). Heutzutage sind 187 verschiedene Varianten bekannt, von denen die meisten aufgrund einer AS-Substitution an Position 238 einen ESBL Phänotyp aufweisen (20) (<https://card.mcmaster.ca/ontology/36024>; Abfrage Februar 2018).

#### 1.1.2.3.3 CTX-M

1989 wurde der erste Vertreter der heutzutage wichtigsten ESBL-Familie, die CTX-M  $\beta$ -Laktamasen, beschrieben (CTX-M = Cefotaximase-Munich) (29). CTX-M hat eine sehr hohe Aktivität gegenüber Cefotaxim und im Gegensatz zu TEM und SHV handelt es sich bei allen Mitgliedern dieser Familie um ESBLs (30). Mittlerweile sind 160 verschiedene Varianten von CTX-M beschrieben worden

(<https://card.mcmaster.ca/ontology/36025>; Abfrage Februar 2018), die anhand ihrer AS-Sequenz in fünf verschiedene phylogenetische Gruppen (1, 2, 8, 9, 25) eingeordnet werden können (31). Eine hohe Sequenzidentität der *bla*<sub>CTX-M</sub> Gene zu chromosomal kodierten  $\beta$ -Laktamasen verschiedener *Kluyvera* Spezies deutet auf eine Mobilisierung von *bla*<sub>CTX-M</sub> Genen aus dem *Kluyvera* Genom in Plasmide hin (32). Die am häufigsten nachgewiesenen Varianten von CTX-M bei Enterobacteriaceae gehören den Gruppen 1 und 9 an (21). Die plasmidale Lokalisierung der *bla*<sub>CTX-M</sub> Gene sowie die Kombination mit erfolgreichen klonalen Linien (insbes. *E. coli* und *K. pneumoniae*) ermöglichte die schnelle weltweite Verbreitung von CTX-M (33). Heutzutage stellt CTX-M die häufigste Ursache für Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation in Enterobacteriaceae dar (21).

#### 1.1.2.3.4 AmpC

AmpC  $\beta$ -Laktamasen gehören der Ambler-Klasse C bzw. BJM-Gruppe 1 an und vermitteln, ähnlich wie die ESBLs, Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen bei Enterobacteriaceae. Zusätzlich zu dem Oxyimino-Cephalosporinen werden jedoch auch Cephamycine und Monobactame hydrolysiert. Dagegen wirken AmpC  $\beta$ -Laktamasen jedoch nicht gegen Cefepim, Cefpirom und Carbapeneme. Charakteristischer Unterschied zu den ESBLs stellt ihre Eigenschaft dar, nicht durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, wie z.B. Clavulansäure oder Tazobactam, gehemmt zu werden. In vielen Enterobacteriaceae Spezies liegen AmpC- $\beta$ -Laktamasen chromosomal kodiert vor; *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* oder *Salmonella* spp. sind dagegen Vertreter von Enterobacteriaceae, die kein chromosomales *ampC* Gen besitzen (34, 35). Bei AmpC  $\beta$ -Laktamasen muss zusätzlich zwischen induzierbaren und konstitutiv exprimierten *ampC*-Genen unterschieden werden. Bei *Citrobacter* spp. oder *Enterobacter* spp. erfolgt die *ampC* Regulation in Anwesenheit eines  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums durch einen komplexen Induktionsmechanismus der hauptsächlich durch drei Enzyme (AmpR (Transkriptionsregulator, unter normalen Zellbedingungen *ampC* Repressor), AmpD und AmpG) des *Peptidoglycan Recycling Pathway* gesteuert wird (36). Unter normalen Wachstumsbedingungen werden Muropeptide (N-Acetylglucosamin-1,6-anhydro-N-acetylmuraminsäure-Peptide) des Peptidoglycan-Abbaus mittels AmpG in das Zytoplasma transportiert, wo sie von AmpD in freie Peptide gespalten werden und wieder für die Zellwandsynthese verwertet werden können (UDP-Pentapeptide). Die UDP-Pentapeptide interagieren mit AmpR, welches daraufhin als *ampC* Repressor fungiert. Unter induzierenden Bedingungen dagegen (Anwesenheit von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika) kommt es zu einer Akkumulation von Muropeptiden im Zytoplasma, welche nicht vollständig von AmpD gespalten werden können. Die akkumulierten Muropeptide verdrängen die UDP-Pentapeptide von AmpR, welches daraufhin hin als Transkriptionsaktivator von *ampC* agiert.



Der häufigste Grund für eine *ampC* Überexpression stellen Mutationen in *ampD* dar. Diese können dementsprechend zu einer Hyperinduktion oder Hyperproduktion von AmpC führen. Aber auch Mutationen in *ampR* und *ampG* können zu einer Überexpression führen (35, 36).

Bei anderen Spezies, wie z.B. *E. coli* oder *Shigella* spp., wird *ampC* aufgrund eines abweichenden Regulationsmechanismus (Abwesenheit des *ampR* Gens) konstitutiv exprimiert (35). Ein resistenter Phänotyp kann in diesem Fall durch Mutationen in der Promotorregion, welche zu einer AmpC Hyperproduktion führt, vermittelt werden (37). Neben den chromosomal-vermittelten AmpC  $\beta$ -Laktamasen gibt es auch Plasmid-vermittelte AmpC  $\beta$ -Laktamasen. Der Entdeckung der ersten Variante (CMY-1) 1989 bei einem *K. pneumoniae* Isolat folgte die Beschreibung weiterer Plasmid-vermittelter AmpC  $\beta$ -Laktamasen in den 1990er Jahren (35, 38). Die Sequenzähnlichkeit der plasmidalen *ampC* Gene zu den chromosomalen Varianten lässt darauf schließen, dass die Plasmid-vermittelten *ampC* Gene ursprünglich chromosomal vorlagen und später mobilisiert worden sind (35). Die am weitesten verbreiteten Plasmid-vermittelten AmpC  $\beta$ -Laktamasen stammen aus der CMY-Familie, mit CMY-2 als häufigste Variante weltweit (39). Das *bla*<sub>CMY-2</sub> Gen zeigt eine hohe Sequenzidentität mit dem chromosomalen *ampC* Gen von *Citrobacter freundii* und wurde vermutlich mittels des Insertionssequenz Elements *ISEcp1* von dessen Chromosom mobilisiert (40). Neben den *C. freundii* ähnlichen AmpC  $\beta$ -Laktamasen umfasst die CMY-Familie weitere AmpC  $\beta$ -Laktamasen mit Ähnlichkeit zur chromosomalen Enzym-Variante von *Aeromonas hydrophila* (41). Derzeit sind 136 verschiedene CMY Varianten beschrieben (<https://card.mcmaster.ca/ontology/36208>; Abfrage Februar 2018). Weitere häufiger vorkommende Varianten neben CMY sind die DHA-Enzyme (23 Varianten mit Ursprung in *Morganella morganii*) und MIR- $\beta$ -Laktamasen (18 Varianten mit Ursprung in *Enterobacter* spp.).

#### 1.1.2.3.5 Carbapenemasen

Der Anstieg der ESBL-bildenden Enterobacteriaceae führte seit Beginn der 2000er Jahre zu einem verstärkten Einsatz von Carbapenemen in der Humanmedizin. Besorgniserregend ist das vermehrte Auftreten von Carbapenemase-produzierenden Gram-negativen Bakterien in den letzten Jahren (42). Carbapenemasen besitzen im Vergleich zu ESBLs oder AmpC  $\beta$ -Laktamasen ein erweitertes Substratspektrum und können, neben fast allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, auch Carbapeneme hydrolysieren (43). Zu den weltweit, häufigsten Carbapenemasen gehören KPC (*Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase), VIM (*Verona-Integron-Metallo- $\beta$ -Laktamase*), NDM (*New-Delhi-Metallo- $\beta$ -Laktamase*) und OXA-48 (42). Carbapenemasen sind äußerst heterogen und lassen sich nach der Einteilung von Ambler den Klassen A (KPC), B (NDM, VIM) und D (OXA-48) zuordnen (43). Die Carbapenemase-Gene sind häufig auf Plasmiden lokalisiert und können durch horizontalen Gentransfer in die verschiedensten Enterobacteriaceae Spezies verbreitet werden.

## 1.2 Mobile genetische Elemente

Der Gentransfer durch horizontalen Gentransfer (HGT) ist elementarer Bestandteil der genomischen Flexibilität. Mobile genetische Elemente (MGE) sind dabei treibende Kraft und helfen bei der Adaption an Umweltbedingungen, Evolution und Diversität von Bakterien (44, 45). Anhand ihrer Eigenschaften lassen sich verschiedene Arten von MGEs, wie z.B. Bakteriophagen, integrative und konjugative Elemente, Insertionssequenzen (IS), Transposons und Plasmide unterscheiden. MGE spielen eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen (46).

### 1.2.1 IS Elemente

Als IS Elemente werden typischerweise kurze mobile DNA Fragmente bezeichnet, welche nur kodierende Sequenzen für Enzyme zur Selbstmobilisierung kodieren. IS Elemente sind in der Regel zwischen 700 bp und 2,5 kb groß, besitzen ein bis zwei Open Reading Frames (ORFs), welche für eine Transposase und deren Regulation kodieren, und werden in der Regel durch charakteristische Endsequenzen flankiert (*Inverted Repeats* – IR). Diese Endsequenzen werden als Erkennungsstelle für die Transposase benötigt. Zwei IS-Sequenzen können zusätzlich Gensequenzen flankieren und diese mobilisieren (*Composite Transposons*) (47). Es wird davon ausgegangen, dass Insertionssequenzen eine Rolle bei der Mobilisierung von Antibiotikaresistenzgen-Sequenzen spielen. Wie bereits erwähnt ist das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M</sub> in *E. coli* vermutlich auf die Mobilisierung von  $\beta$ -Laktamasegenen aus der Gattung *Kluyvera* zurückzuführen (48). Unter Umständen können IS-Elemente Einfluss auf die Expression umliegender Gene nehmen. *ISEcp1* scheint bei *bla*<sub>CTX-M</sub>, wie auch *bla*<sub>CMY-2</sub> die Überexpression durch die Bereitstellung eines starken Promotors zu bewirken (35, 49).

### 1.2.2 Plasmide

Plasmide sind in der Regel doppelsträngige, zirkuläre DNA Moleküle, welche in der Lage sind, sich unabhängig vom Wirtschromosom zu replizieren (1). Plasmide beinhalten immer Gene für ihren Replikationsapparat (Replikon). Konjugative Plasmide tragen zusätzlich die notwendigen Gene für ihre Mobilisierung und Konjugation. Neben den Replikations-, Mobilisierungs- und Stabilisierungssystemen kodieren Plasmide häufig noch für sogenannte *Accessory* Gene, wie z.B. Resistenzgene (z.B. für Antibiotika- oder Schwermetallresistenz), Virulenzgene und Gene, die metabolische Prozesse beeinflussen. Die Aufnahme von Plasmiden mit zusätzlichem genetischem Material kann unter selektiven Bedingungen einen erheblichen Vorteil bringen. Aufgrund ihres unterschiedlichen Aufbaus variieren Plasmide in ihrer Größe erheblich. Bei Enterobacteriaceae sind beispielsweise Resistenzgen-tragende Plasmide von 6 bis 400 kB bekannt (50).

Eine Möglichkeit der Plasmid-Klassifizierung basiert auf der Plasmid-Inkompatibilität (51). Dabei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass zwei Plasmide mit einem identischen Replikontyp nicht in derselben Zelle

koexistieren können. Das ursprüngliche, auf der Inkompatibilität basierende, Schema wurde jedoch durch eine Typisierung von DNA-Sequenzen, welche für die Plasmidreplikation essentiell sind, abgelöst (52). Die Identifizierung der Replikons ist per PCR möglich (die sogenannte PCR-basierte Replikontypisierung - PRBT); ursprünglich wurden die Replikons durch Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert. Derzeit sind 28 verschiedenen Replikontypen bei Enterobacteriaceae bekannt (53, 54). Für einige Plasmidtypen (IncA/C, IncI und IncN) wurden zur besseren Charakterisierung zusätzliche und höher auflösende Typisierschemata entwickelt, die sogenannte Plasmid Multilokus Sequenztypisierung (pMLST), welche analog zur Spezies-spezifischen Multilokus Sequenztypisierung funktionieren (siehe **Abschnitt 1.3.1**) (55-57). Neben der Replikontypisierung existieren weitere Methoden zur Plasmidklassifizierung, wie z.B. das „*Plasmid Partition Gene Typing*“ (PAR-T) oder die Typisierung der Relaxase Gene (MOB Typing) (58, 59).

Plasmide spielen eine große Rolle bei der Verbreitung von ESBLs und sind der Lage, diese Resistenzgene innerhalb einer Spezies und zwischen verschiedensten Spezies zu übertragen (60, 61). Häufig identifizierte ESBL-Gen-tragende Plasmide sind vom Inc-Typ F, I, A/C und H. In der Verbreitung der einzelnen Plasmidtypen und korrespondierenden ESBL-Gene zwischen geografischen Regionen und Wirtsorganismus lassen sich Unterschiede beobachten (50): Während in Europa Tiere hauptsächlich mit IncI1 Plasmiden tragenden *E. coli* mit besiedelt sind, so lassen sich bei asiatischen Tierisolaten IncF Plasmide und bei Nord- und Südamerikanischen Tierisolaten IncA/C Plasmide als dominante Plasmidvarianten identifizieren. Die einzelnen ESBL-Varianten assoziieren zudem oft mit spezifischen Plasmidvarianten: *bla*<sub>CTX-M-15</sub> wird beispielsweise häufig auf IncF Plasmiden identifiziert (62).

### 1.3 Spezies *E. coli*

*Escherichia coli* ist eine der am intensivsten untersuchten bakteriellen Spezies. Bei dem 1885 von Theodor Escherich beschriebenen Bakterium handelt es sich um ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes Stäbchen, welches der Familie der Enterobacteriaceae angehört (1). *E. coli* kann anhand seiner klinischen und genetischen Eigenschaften in kommensale (nicht-pathogene) und abhängig vom Infektionsort in intestinal pathogene (InPEC) und extraintestinal pathogene (ExPEC) *E. coli* unterteilt werden (63). Kommensale *E. coli* repräsentieren einen Teil der permanenten Darmflora beim Menschen, bei vielen anderen Säugern und Vögeln (5, 64). Auch ExPEC *E. coli* können durch asymptomatische Besiedlung Teil der normalen, intestinalen Flora von gesunden Individuen sein (65). Außerhalb dieses Habitats jedoch können sie Verursacher von z.B. Harnwegsinfektionen, Blutstrominfektionen und neonataler Meningitis sein (65-67). InPEC und ExPEC werden anhand ihrer phänotypischen Virulenz-Eigenschaften in verschiedene Pathovaren unterteilt. Unter die Einteilung InPEC fallen unter anderem

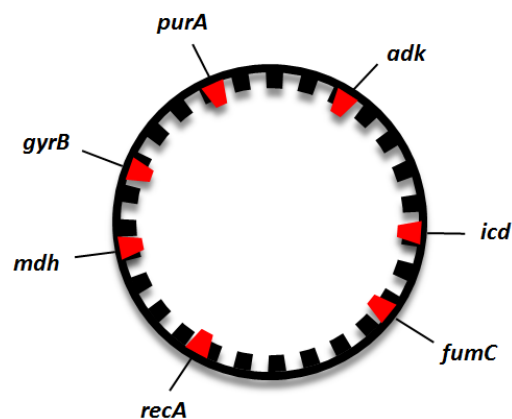
STEC (Shigatoxin-bildende *E. coli*), ETEC (enterotoxische *E. coli*) und EPEC (enteropathogene *E. coli*), während die Gruppe ExPEC uropathogene *E. coli* (UPEC), Sepsis-assoziierte *E. coli* (SEPEC), NMEC (Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli*) und APEC (*Avian pathogene E. coli*) umfasst.

### 1.3.1 *E. coli* Phylogenie

Basierend auf der Arbeit von Selander aus dem Jahr 1987 wurde die *E. coli* Population in sechs phylogenetische Gruppen (A, B1, B2, C, D und E) unterteilt. Die phylogenetische Einteilung wurde anhand einer Multilokus Enzym Elektrophorese (MLEE) Analyse durchgeführt, die auf 35 Loci der ECOR Sammlung („*E. coli* Reference“) basierte, einer möglichst repräsentativen Sammlung von *E. coli* Stämmen, die nach geographischer Herkunft und verschiedenen Wirtsspezies zusammengestellt wurde (68, 69). Die ursprüngliche phylogenetische Einteilung von *E. coli* wurde 1990 von Herzer *et al.* auf fünf phylogenetische Gruppen angepasst (A, B1, B2, D und E) und in zahlreichen Studien auf der Basis verschiedener Analysemethoden bestätigt (69, 70). *E. coli* Isolate der phylogenetischen Gruppen unterscheiden sich phänotypisch voneinander, nehmen unterschiedliche ökologische Rollen ein und zeigen verschieden hohe Prävalenzen der phylogenetischen Gruppen bei Mensch und Tier (71). Isolate der Gruppen B2 und D umfassen häufig die virulenteren ExPEC Isolate, während kommensale *E. coli* meist den Gruppe A und B1 zugeordnet werden (66). Eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung der phylogenetischen Gruppe stellte die im Jahr 2000 von Clermont *et al.* entwickelte „Phylogruppen“ Triplex-PCR dar. Anhand dieser PCR können *E. coli* Isolate anhand vorhandener oder abwesender Markergene in die wichtigsten phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D eingeordnet werden (72). Eine Erweiterung dieser Methode um die später definierten und seltenen Gruppen C, E, F und *Escherichia cryptic clade I* wurde 2013 veröffentlicht (73).

Trotz der relativ guten Wiedergabe der phylogenetischen Gruppen von *E. coli* bildet die Enzym-Elektrophorese keine optimale Datengrundlage für phylogenetische Analysen, da Enzyme mit geringer Sequenzähnlichkeit eine ähnliche elektrophoretische Mobilität aufweisen können (74). Die Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erwies sich dagegen methodisch als besser, da diskrete Allele für die Loci abgebildet werden können (75). Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST), eine auf der Nukleotidsequenz-basierende Methode zur Beschreibung der klonalen Diversität und genetischen Struktur einer Bakterienpopulation, z.B. von klonalen Linien, hat sich dabei als Alternative zur MLEE für phylogenetische Untersuchungen bei *E. coli* etabliert (76). Der resultierende Vorteil der MLST im Vergleich zur Einteilung in phylogenetische Gruppen anhand der MLEE (oder Phylogruppen PCR) ist die viel höhere Auflösung der phylogenetischen Struktur. Grundlage der MLST bilden Punktmutationen innerhalb konservierter, sogenannter „Haushaltsgene“ (*housekeeping genes*), die für den bakteriellen Stoffwechsel essentiell sind. Typischerweise werden Fragmente von 6 - 8 *housekeeping genes*, verteilt über das gesamte Chromosom, ausgewählt (**Abbildung 5**). Jede Punktmutation ergibt dabei eine

spezifische Allelvariante und die Allelkombination der sieben *housekeeping genes* den Sequenztyp (ST). Für *E. coli* wurden drei verschiedene MLST Schema, die jeweils verschiedene Genkombinationen zur Typisierung nutzen, publiziert: das „Warwick“ (77), „Pasteur“ (78) und „Michigan“ (79) Schema. Das Warwick Schema ist dabei das verbreitetste MLST Schema für *E. coli* und gibt, nach einer vergleichenden Analyse der drei Schemata von Clermont *et al.*, die „wahre“ Phylogenie von *E. coli* am besten wieder (80). Mit Hilfe des Warwick Schemas sind aktuell über 8 000 verschiedene Sequenztypen identifiziert worden (stand Februar 2018). Dies gibt einen Einblick in die enorme phylogenetische Diversität dieser Spezies.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der 7 MLST Allele (rot) aus dem Warwick Schema auf dem *E. coli* Chromosom. Gegenübergestellt ist die genomweite Abdeckung von Loci (schwarz) eines cgMLST Schemas. Modifiziert nach <http://www.ridom.de/seqsphere/cgmlst/> und Wirth *et al.* (77).

Interessanterweise sind trotz der hohen Vielfalt an Sequenztypen einige wenige unter ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* dominant, während die Mehrheit der ST nur in geringer Zahl identifiziert werden. Beim Menschen ist der *E. coli*-ST131 besonders häufig (siehe **Abschnitt 1.3.2.1**). Neben ST131 wurden unter anderem ST10, ST410 und ST648 als häufiger vorkommende Varianten beschrieben (81). Da ein Sequenztyp bzw. eine klonale Linie wiederum aus vielen verschiedenen Klonen besteht, kann eine detaillierte Untersuchung von Isolaten eines Sequenztyps anhand weiterer Analysemethoden, wie z.B. der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), einen Einblick in die Struktur einer klonalen Linie bieten (82, 83).

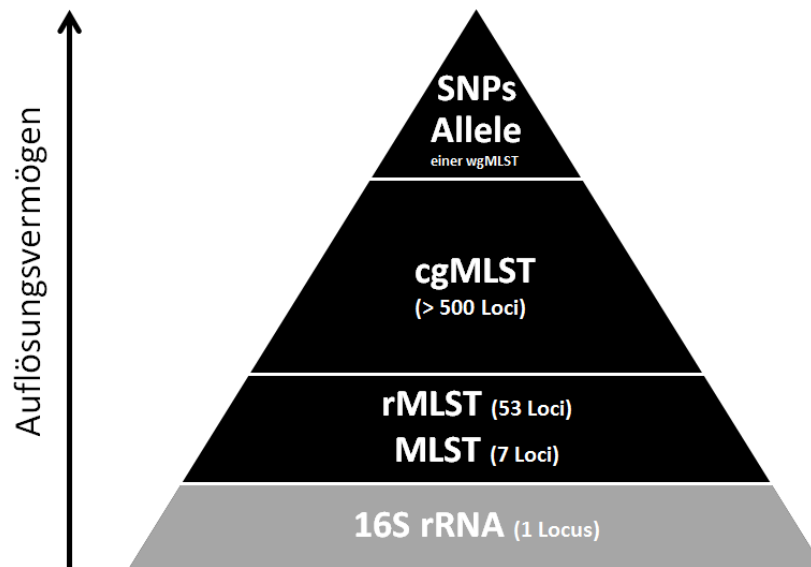
### 1.3.2 Ganzgenombasierte phylogenetische Analysen

Eine logische Erweiterung der auf Genloci-basierenden MLST stellt die Ganzgenom-basierende phylogenetische Analyse dar (84). Statt nur einige wenige Loci (im Fall des Warwick Schemas 7 Loci) werden möglichst viele Gene/Loci als phylogenetische Marker genutzt. Dabei kann zwischen unterschiedlichen Ansätzen, der cgMLST (cg = *core genome*; „Kerngenom-MLST“) und der wgMLST (wg = *whole genome*; „Ganzgenom-MLST“), unterschieden werden. Bei der cgMLST wird eine im Vorfeld definierte und auf einer Referenzsequenz basierende Auswahl an Genen, welche in möglichst allen

Vertretern der Spezies vorkommen (das sogenannte Kerngenom), analysiert. Dieses bietet eine vielfach höhere Auflösung als die klassische MLST (**Abbildung 5** und **Abbildung 6**), und ermöglicht, analog zu dieser, anhand einer einheitlichen Nomenklatur, international-vergleichbare Untersuchungen von Isolaten. (85). Eine zentrale Kuratierung der Daten ist hierbei jedoch entscheidend. Für *E. coli* wird aus Mangel eines einheitlichen publizierten cgMLST Schemas in der Regel der Ansatz eines *ad hoc* cgMLST Schemas verfolgt (86-88). Diese Erstellung erfolgt analog zu einem etablierten cgMLST Schema, kann aber referenzbedingt im Set der zu analysierenden Gene variieren und damit folglich auch in den Analyseergebnissen. Vergleiche zwischen zwei *ad hoc* cgMLST Schemata sind daher nur bedingt möglich. Die wgMLST dagegen basiert auf dem Vergleich aller gemeinsam vorhandenen Gene der zu analysierenden Isolate. Da die wgMLST im Gegensatz zur cgMLST auf den direkt zu analysierenden Isolaten beruht, wird eine größere Anzahl an Genen berücksichtigt und ermöglicht somit eine nochmals höhere Auflösung. Nachteilig ist dagegen die mangelnde Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zwischen unterschiedlichen Populationen bzw. Studien, da jede Analyse aufgrund der eingeschlossenen Isolate einzigartig ist (89).

Zusätzlich können sich beim Einsatz eines wgMLST Ansatzes bei *E. coli* Probleme durch das große Pangenom von *E. coli* ergeben. Die durchschnittliche Anzahl an Genen des *E. coli* Genoms liegt bei ca. 5 000, kann aber je nach analysierten Genomen variieren: Tenaillon *et al.* identifizierten anhand von 20 Genomen eine durchschnittliche Genanzahl von 4 721, während Rasko *et al.* 5 020 Gene im durchschnittlichen *E. coli* Genom (17 eingeschlossene Genome) ermittelten (71, 90). Das Kerngenom von *E. coli* kann dagegen auf ca. 2 277 ( $\pm 224$ ) Gene geschätzt werden (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, **Abbildung A-4**) (71, 90). *E. coli* besitzt jedoch, wie viele andere rekombinative Bakterien, ein großes offenes Pangenom. Das bedeutet, dass die Anzahl der orthologen Gene mit jedem zusätzlich analysierten Genom ansteigt. Dadurch wächst bei einer wgMLST Analyse das wgMLST Schema mit jedem zusätzlich eingeschlossenen Genom. Tenaillon *et al.* ermittelten das *E. coli* Pangenom auf 10 131 Gene, während Rasko *et al.* das Potential des *E. coli* Pangenoms auf > 13 000 Gene einschätzen. Eine Analyse der Plattform EnteroBase ermittelte, basierend auf 533 *E. coli* Genomen, die Größe des Pangenoms sogar auf 34 044 Gene, bzw. nach Abzug von Genen mit über 70 % Aminosäureähnlichkeit auf immer noch 25 002 Gene.

Alternativ zu Gen-basierten Vergleichen können auch SNP-basierte Analysen Aufschluss über die phylogenetischen Beziehungen von Organismen geben. Im Gegensatz zu den Gen-basierten Analysemethoden cgMLST und wgMLST, welche nur kodierende Sequenzabschnitte berücksichtigen, werden bei SNP-basierten Ansätzen auch intergenische Regionen in die Analyse mit eingeschlossen. Insbesondere bei eng verwandten Isolaten, wie z.B. die Isolate einer klinischen Ausbruchssituationen, bieten wgMLST und SNP-basierte Analysen einen Mehrwert gegenüber Verfahren wie MLST und cgMLST (91).



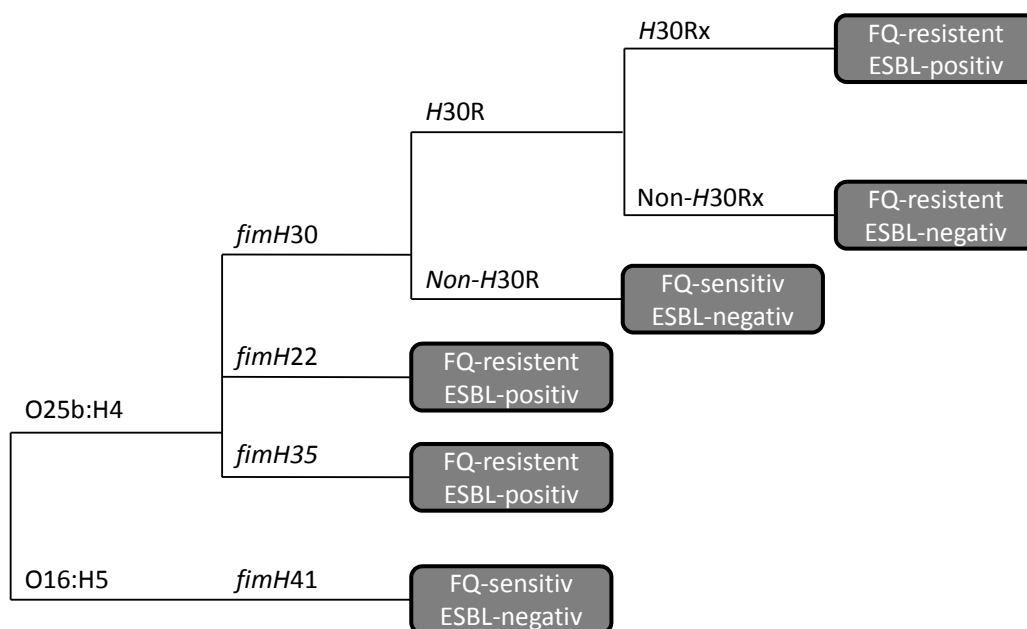
**Abbildung 6: Gegenüberstellung verschiedener phylogenetischer Analysemethoden und ihrer Auflösungsvermögen.**  
 Adaptiert nach <http://www.ridom.de/seqsphere/cgmlst/> und Maiden *et al.* (84).

### 1.3.2.1 *E. coli* ST131

Die derzeit weltweit erfolgreichste klonale Linie von *E. coli* gehört dem Sequenztyp ST131 an. Die Erstbeschreibung von *E. coli*-ST131 als sogenannter „pandemischer Klon“ wurde 2008 von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich und Kanada zeitgleich veröffentlicht (92, 93). Bei der Analyse der Populationsstruktur humaner, klinischer ESBL-produzierender *E. coli* aus mehreren Ländern auf drei Kontinenten wurde ein CTX-M-15-produzierender Klon des Serotyps O25 entdeckt. Retrospektive Studien dokumentierten, dass die weltweite Verbreitung dieses Klons Mitte der 2000er Jahre begann, während in den Jahren zuvor ST131 nur sporadisch nachgewiesen wurde (33). Bei *E. coli*-ST131 handelt sich um einen häufigen Verursacher von ambulant erworbenen als auch nosokomialen Infektionen, wie z.B. Harnwegsinfektionen und Bakteriämien (94, 95). Grundlegende Eigenschaften sind seine Einteilung zur als virulent eingeschätzten phylogenetischen Gruppe B2, sein hohes Virulenzpotential und die Angehörigkeit zum Serotyp O25b:H4 oder O16:H5, sowie die Fluorchinolonresistenz und Drittgenerations-Cephalosporinresistenz, bedingt durch die Anwesenheit eines IncFII Plasmids mit dem ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (92, 95). Zudem wird ST131 eine vergleichbar höhere Fitness als anderen klonalen Linien zugesprochen, welche vermutlich auf eine erfolgreiche Anpassung an das humane Blasenmilieu und die Wirts-Immunmodulation zu diesem Zweck zurückzuführen ist (95-98).

Weitere kombinierte phylogenetische Analysen mittels Serotypie und PFGE zeigten, dass ST131 nicht durch einen einzigen Klon repräsentiert wird, sondern verschiedene Subtypen umfasst (99, 100). Die klonale Struktur von ST131 kann, basierend auf Varianten von genetischen Markern, in drei Kladen (A, B und C) unterteilt werden, die sich wiederum noch in Subtypen aufspalten (101). Markergene zur

Unterscheidung der Klade sind *gyrA* (DNA Gyrase Untereinheit A), *parC* (DNA Topoisomerase 4 Untereinheit A) und *fimH*, ein Typ I Fimbrien Adhäsion, welches ST131 wie fast alle *E. coli* besitzen (46, 102). Das *fimH* Gen wird als phylogenetisch distinkt angesehen und bietet sich aufgrund der hohen Alleldiversität als phylogenetischer Marker an (103). In einer Studie aus dem Jahr 2013 wurden 352 historische ST131 Isolate auf ihre *fimH* Allele untersucht. Insgesamt konnten dabei sieben verschiedene *fimH* Allele identifiziert werden (*fimH15*, *fimH22*, *fimH27*, *fimH30*, *fimH35*, *fimH41* und *fimH94*), mit *fimH30*, *fimH22* und *fimH41* als häufigste Varianten (104). Die einzelnen *fimH* Varianten können mit den Klade von ST131 assoziiert werden: Klade A (*fimH41* ST131-O16), Klade B (*fimH22* ST131-O25b) und Klade C (*fimH30* ST131-O25b) (**Abbildung 7**). Johnsen *et al.* beobachteten, dass der Großteil der *fimH30* tragenden Isolate, basierend auf einer spezifischen *gyrA* und *parC* Allelkombination, Fluorchinolon-resistent waren (104). SNP-basierte Ganzgenomanalysen von Price *et al.* konnten schließlich zeigen, dass in der ST131-*fimH30* Linie zwei dominante Fluorchinolon-resistente Sublinien existierten: *H30-R* und *H30-Rx*, letztere war, zusätzlich zur Fluorchinolonresistenz, ESBL-bildend (100). Diese Beobachtungen und Analysen historischer Isolate lassen darauf schließen, dass die ST131 *fimH30* Linie vermutlich einen gemeinsamen Fluorchinolon-sensiblen *fimH30* Vorfahren hatte. Ben Zakour und Kollegen modellierten, basierend auf ca. 200 *E. coli* ST131 Genomsequenzen, die phylogenetische Historie von ST131 und bestätigten die Hypothese eines gemeinsamen *fimH30* Vorfahren (101). Durch Mutationen in den *gyrA*



**Abbildung 7: Darstellung der *E. coli* ST131 Phylogeniestruktur, adaptiert nach Mathers *et al.* (46).** Den jeweiligen Subkladen sind die Resistenzeigenschaften zur ESBL-Produktion und Fluorchinolonresistenz (FQ) angegeben.



und *parC* Allelen bildete sich die Fluorchinolon-resistente Klade C aus, welche sich dann später aufgrund des Erwerbs eines *bla*<sub>CTX-M-15</sub> tragenden Plasmids in die Sublinien H30-R und H30-Rx aufteilte.

Die *E. coli*-ST131 Prävalenz ist abhängig von der geographischen Region und Studienpopulation (46). In klinischen Isolaten variiert der Anteil von *E. coli*-ST131 beispielsweise zwischen 10 und 30 % aller Isolate (86). Bei ESBL-produzierenden *E. coli* vom Mensch ist ST131 der am häufigsten identifizierte Sequenztyp; in Deutschland wurde ein Anteil von 30 - 40 % bei Isolaten aus ambulanten Infektionen (Harnwegsinfekte) und bei Isolaten aus nosokomialen Infektionen detektiert (95, 105, 106). Dagegen lag der Anteil von ESBL-bildenden *E. coli*-ST131 in der gesunden Allgemeinbevölkerung bei nur 12 % (105). Veterinärmedizinische Studien zeigten, dass dieser beim Menschen häufige Sequenztyp bei Nutztier, Haustier oder Wildtieren nur sehr selten vorkommt (Prävalenz ca.  $\leq 1$  %) (81). Hohe Ähnlichkeiten (Resistenzeigenschaften, Virulenzgene, Genotyp) von Isolaten, welche bei Mensch und Tier gefunden wurden, deuten auf einen Inter-Spezies-Transfer hin, wobei ein eindeutiger Nachweis bisher noch aussteht (81, 107). Das generelle, weltweite Auftreten von *E. coli* mit CTX-M-15 in den letzten 10 Jahren ist vermutlich auf den steigenden Anteil der *E. coli*-ST131 mit einem *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragenden Plasmid zurückzuführen (46). Während bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen oftmals horizontaler Gentransfer die tragende Rolle spielt, ist ST131 ein gutes Beispiel für die klonale Verbreitung von Resistenz: Die Kombination aus Antibiotikaresistenz-vermittelndem Plasmid, den ST131 spezifischen Virulenzfaktoren und der daraus folgenden möglicherweise höheren Fitness von ST131 scheint die klonale Verbreitung von ST131 sowohl bei Krankenhauspatienten als auch als (temporärer) Darmbesiedler in der gesunden Bevölkerung zu fördern (98, 108). Welche und ob überhaupt Virulenzfaktoren bei der Fitness und Adaption von ST131 eine Rolle spielen, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen (66). Nichtsdestotrotz sind auch Fälle von HGT zwischen ST131 und nicht-ST131 Isolaten bekannt (109).

### 1.3.3 Transmission von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* und zoonotisches Potential

ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* werden nicht nur im humanen Bereich nachgewiesen; auch bei Nutz- und Haus- und Wildtieren werden zunehmend diese resistenten Isolate nachgewiesen. (81, 110, 111). Seit dem Beginn der 2000er Jahre lässt sich ein verstärkter Anstieg von ESBL/AmpC-Bildnern im veterinärmedizinischen Bereich und bei tierischen Lebensmitteln beobachten (112). Daten aus Resistenzmonitoring-Programmen sowie einzelne Studien zeigten, dass im Bereich der Tiermast Betriebsprävalenzen Cefotaxim-resistenter *E. coli* von bis zu 87 % bei Rindern, 85 % bei Schweinen und sogar 100 % bei Geflügel in Deutschland möglich sind (113-115). Ebenfalls hohe Kontaminationsraten (44 - 100 %) wurden bei Lebensmitteluntersuchungen von Geflügel und Putenfleisch in Deutschland und weiteren europäischen Ländern festgestellt (116-118). Die hohen Raten an Drittgenerations-

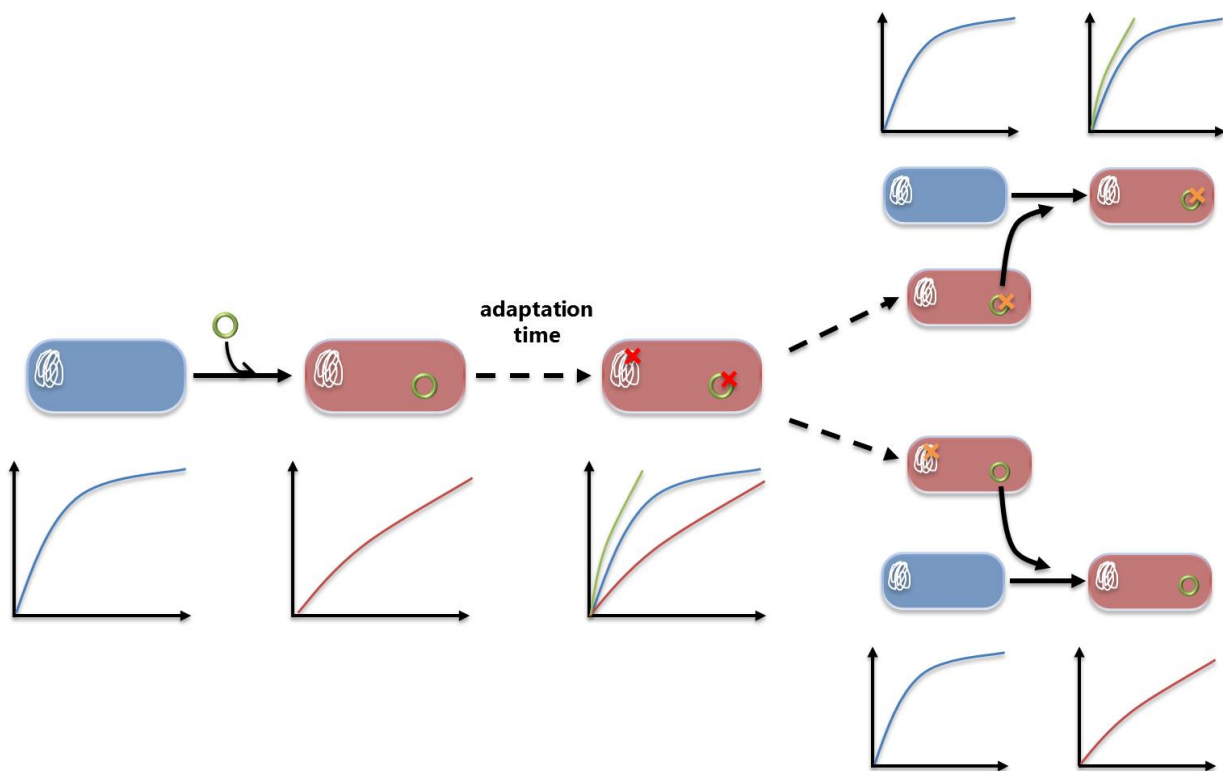
Cephalosporin-resistenten *E. coli* in Nutztier und auf Lebensmittelproben lassen ein mögliches Risiko für eine Weiterverbreitung der ESBL-bildenden *E. coli* entlang der Lebensmittel(produktions)kette vermuten. Da die Weitergabe ESBL-bildender *E. coli* zum einen klonal (vertikal), aber, bedingt durch mobile genetische Elemente, auch horizontal erfolgen kann, müssen bei der Untersuchung der epidemiologischen Zusammenhänge neben allgemeinen Verwandtschaftsanalysen auch die ESBL/AmpC-Varianten und die Plasmide, die diese Gene tragen, untersucht werden.

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen ESBL/AmpC-produzierenden Isolaten vom Mensch und Tier zeigt sich anhand der unterschiedlichen auftretenden Varianten. Während die am häufigsten im menschlichen und tierischen Bereich auftretenden ESBL-Varianten grundsätzlich CTX-M-1, CTX-M-14 und CTX-M-15 sind, unterschieden sich diese aber deutlich in ihren Häufigkeiten bei Mensch und Tier (81). Häufigste ESBL-Variante beim Menschen ist CTX-M-15, z.T. bedingt durch den großen Anteil von *E. coli*-ST131 (105). Bei ESBL-bildenden *E. coli* von Rind und Schwein dominiert dagegen die Variante CTX-M-1; bei Geflügel sind die ESBL-Varianten CTX-M-1 und SHV-12 sowie die AmpC-Variante CMY-2 besonders häufig (119). Untersuchungen von tierischen Lebensmittelproben ergaben ein ähnliches Verteilungsbild der ESBL/AmpC-Varianten (116, 120, 121).

Die Untersuchung der phylogenetischen Gruppen gibt, wie in **Abschnitt 1.3.1** erläutert, nur ein grobes Abbild der *E. coli* Population, kann aber in Kombination mit weiteren phylogenetischen Markern Hinweise auf Verbreitungswege geben (119). Mittels MLST nachgewiesene klonale Linien von ESBL-bildenden *E. coli* zeigen nur geringe Schnittmengen bei der Verteilung der ST; der Großteil der ST im humanen Bereich (z.B. ST131) wird nicht im veterinären Bereich identifiziert (81). Häufig nachgewiesene Sequenztypen im veterinären Bereich sind ST10, ST38 und ST410 (81, 122, 123). Insbesondere ST410 rückte aufgrund seines Vorkommens in humanen wie auch veterinären Proben in den Fokus. Im Gegensatz zu beispielsweise ST131 scheint ST410 in der Lage zu sein, sowohl Mensch als auch Tier (Wildvögel, Hund, Rind, Huhn und Schwein) zu kolonisieren. Anhand von Ganzgenomvergleichen wurden hochidentische Isolate verschiedenster Herkunft identifiziert. Dies deutet auf mögliche Übertragungen zwischen verschiedenen Spezies hin (124, 125). Ganzgenomvergleiche von ESBL-tragenden *E. coli* aus den Niederlanden zeigten dagegen wenig Ähnlichkeit der *E. coli* Isolate von Mensch und Tier, aber hohe Ähnlichkeiten der ESBL-Gen-tragenden Plasmide (126). Da diese Plasmide in verschiedene *E. coli* Stämme sowie in andere Enterobacteriaceae-Spezies übertragen werden können, trägt die genaue Charakterisierung dieser Plasmide zur Aufklärung von Transmissionsrouten bei.

## 1.4 Resistenz und bakterielle Fitness

Als Fitness wird die Überlebens- oder Reproduktionsfähigkeit eines Individuums oder (bakteriellen) Genotyps bezeichnet. Der Erwerb eines Antibiotikaresistenz-Mechanismus führt oftmals, unabhängig ob durch horizontalen Gentransfer oder durch Mutation erworben, zu einer reduzierten Fitness eines Bakteriums, welche sich in reduzierter Wachstumsrate, reduzierter Virulenz oder geringerer kompetitiver Eigenschaften darstellen kann (127, 128). Neben Resistenzgenen tragen Plasmide häufig Gene weiterer Funktionen, welche zelluläre Prozesse des Wirtes behindern können (129). Beispielsweise können plasmidal kodierte, regulatorische Proteine chromosomale Gene inhibieren (130). Zudem ist die Replikation und Expression von zusätzlichen genetischen Elementen für eine Bakterienzelle energieaufwändig (130). Dennoch führt unter selektierenden Bedingungen der Erwerb einer antimikrobiellen Resistenz zu einem Vorteil für den resistenten Organismus (127, 131), unter nicht selektierenden Bedingungen stellen Fitnesskosten jedoch einen selektiven Nachteil gegenüber Antibiotika-empfindlichen Bakterien dar. Es ist daher anzunehmen, dass die Abwesenheit eines Antibiotikaselektionsdrucks langfristig zu einer Verdrängung und schließlich Auslöschung des resistenten Bakterienstamms, bzw. des Antibiotikaresistenz-Mechanismus in der Population führt (132). Experimentelle und theoretische Studien unterstützen diese Hypothese (132, 133). Diese Beobachtungen schürten die Hoffnung, dass durch verringerten Antibiotikaeinsatz eine Reduktion der Antibiotika-resistenten Bakterien zu ermöglichen sei (128). Trotz seiner Einfachheit erwies sich dieses Konzept jedoch unter natürlichen Bedingungen als nicht erfolgreich (128, 134, 135). In weiteren Studien, die sich mit der bakteriellen Fitness von resistenten Stämmen beschäftigen wurde, auch beobachtet, dass negative Effekte durch kompensatorische Mutationen in Plasmid und Chromosom egalisiert wurden und teilweise sogar zu einer verbesserten Fitness führten (**Abbildung 8**) (128, 136, 137). Der Einfluss eines Plasmiderwerbs auf die bakterielle Fitness kann durch Analysen in isogenen Stammhintergründen untersucht werden (**Abbildung 8** und **Abbildung 9**). Dies ermöglicht im Gegensatz zur Untersuchung klinischer Isolate eine Analyse möglicher Adaptionseffekte unabhängig von eventuell schon angepassten Plasmid-Wirt-Kombinationen, bedingt durch vorherige Adaptionsprozesse (128). Verschiedene methodische Ansätze ermöglichen die Messung der bakteriellen Fitness, häufig wird aber die Wachstumsrate als Marker für die Fitness eingesetzt, entweder durch direkte kompetitive Wachstumsversuche oder durch ermittelte Wachstumsraten, welche gegen einen Referenzstamm normalisiert werden (131). Da die Fitness eines Organismus sehr relativ ist, können Versuchsparameter die Ergebnisse einer Studie stark beeinflussen und geben daher nicht zwangsläufig Vorhersagen über Effekte unter natürlichen Bedingungen. Grundsätzlich lässt sich aber erwarten, dass im Labor beobachtete Fitnesskosten auch unter natürlichen Bedingungen auftreten und Einfluss haben können (128).



**Abbildung 8: Auswirkung eines Plasmiderwerbs auf die Fitness eines Bakteriums und mögliche kompensatorische Effekte.** (a) Der Erwerb führt zu einem Fitnessverlust (ein möglicher Fitnessmarker kann die Wachstumsrate sein). Der Effekt kann nach einer Adaptionszeit entweder durch kompensatorische Effekte im Chromosom oder Plasmid kompensiert, überkompensiert oder unbeeinflusst bleiben. (b) Der Transfer eines solchen adaptierten Plasmids führt daher nicht mehr zu einem Fitnessverlust. (c) Kommt es zu kompensatorischen Mutationen im Chromosom wird dieser Effekt nicht über horizontalen Gentransfer weitergegeben und der Erwerb des Plasmids führt für den neuen Host abermals zu einer verringerten Fitness. Adaptiert nach Starikova *et al.*

## 1.5 Zielstellung dieser Arbeit

Zur Analyse des Vorkommens antibiotikaresistenter Darmbakterien, deren Herkunft und möglicher Transferwege von Antibiotikaresistenzen zwischen humanen und tierischen Reservoirs, wurden verschiedene Studien durchgeführt. Diese erfolgten im Rahmen des RESET Forschungsverbundes (<http://www.reset-verbund.de/>). Im Fokus des RESET Projekts stand die Untersuchung von zoonotischen Erregern, insbesondere von ESBL und pAmpC produzierenden *E. coli*. Ziel war es, die im Verbund gewonnen Erkenntnisse aus epidemiologischen, molekularen und pharmakologischen Untersuchungen an resistenten Bakterien in ein Risikobewertungskonzept einfließen zu lassen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des RESET Verbundprojekts angefertigt und umfasste folgende Studien:

### 1.5.1 ESBL *E. coli* Populationsstudie

Im Rahmen von drei Studien aus der ersten Förderperiode des RESET-Verbundprojekts wurden ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate aus nosokomiale und ambulanten Hintergrund und der gesunden Allgemeinbevölkerung gesammelt, die vorhandenen ESBL-Gene typisiert, sowie eine erste phylogenetische Einteilung der Isolate entsprechend ihrer phylogenetischen Gruppen vorgenommen (11, 138, 139). Die Studien zeigten, dass ein Großteil (ambulant: ca. 50 %, nosokomial: ca. 42 %) der Isolate der phylogenetischen Gruppe B2 angehörten, in welcher sich auch die klonale Linie ST131 einordnet. Im Rahmen dieser Studien wurden zur weiteren Differenzierung der Populationsstruktur MLST Analysen ausgewählter Isolate angestrebt, sowie der Anteil von ST131 aller Isolate mittels einer ST131-spezifischen PCR bestimmt (77, 140). Ziel dieser Studie war es eine Übersicht über die Verteilung der klonalen Linien zu erhalten und den Anteil der erfolgreichen klonalen Linie ST131 bei *E. coli* in Deutschland innerhalb verschiedener Settings zu ermitteln.

### 1.5.2 CMY-2 Studie

Im Rahmen der ersten Förderperiode des RESET-Projekts wurden in Tierstudien vermehrt AmpC-bildende *E. coli* bei Mastgeflügel und Geflügelprodukten nachgewiesen: Bei Untersuchungen von Cephalosporin-resistenten *E. coli* Isolaten von Mastgeflügel wurden 20 - 30 % der Isolate positiv auf CMY-2 getestet (113, 114, 141). Ebenso wiesen ca. 15 % der getesteten Isolate mit Cephalosporinresistenz von Geflügelfleischprodukten *bla*<sub>CMY-2</sub> auf (121). Im Gegensatz dazu ließen sich in den RESET Studien zur ESBL-Besiedlung der Allgemeinbevölkerung und ESBL-produzierenden *E. coli* aus ambulanter und stationärer Versorgung nur vereinzelt *bla*<sub>CMY-2</sub> positive Isolate nachweisen (11, 105, 139). Entsprechende, im Laufe der Projektlaufzeit gesammelte, *bla*<sub>CMY-2</sub> positive Isolate aus der Tiermast und von Tierprodukten, sowie in Zusammenarbeit mit Diagnostiklaboren zusammengetragene *bla*<sub>CMY-2</sub>

positive Isolate vom Menschen, wurden mittels der Illumina MiSeq Technologie sequenziert. Anhand der Sequenzdaten wurden im Anschluss phylogenetische Untersuchungen durchgeführt, sowie die *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Plasmide identifiziert und charakterisiert und die direkte genetische Umgebung des Resistenzgens analysiert. Ziel der Studie war es, Aussagen über die Verwandtschaft von humanen und tierischen CMY-2-positiven *E. coli* Isolaten treffen zu können und anhand der Ähnlichkeit der Isolate einen möglichen Sektor übergreifenden Austausch oder eine Transmission entlang der Nahrungskette zu identifizieren.

### 1.5.3 Fitness Studie

Ein wichtiger Faktor für die horizontale Verbreitung von Antibiotikaresistenzen sind die Fitnesskosten eines Plasmides. Konjugative Plasmide, die Antibiotikaresistenzgene tragen, sind unter selektiven Bedingungen vorteilhaft für den bakteriellen Wirt, können aber in Abwesenheit eines antibiotischen Selektivdrucks Fitnesskosten verursachen. Resistenzgen-tragende Plasmide zeigen jedoch oft niedrige Fitnesskosten oder sogar positive Finesseffekte, die für eine spezifische Plasmid-Wirtsadaptation sprechen (131). Ziel dieser Teilstudie war es daher, die Anpassungsmechanismen konjugativer Resistenzplasmide *in vitro* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Carbapenemase-, AmpC- oder ESBL-Gen-tragende Plasmide mittels Konjugation in einen isogenen Stammhintergrund übertragen. Zur Charakterisierung der Finesseffekte des Plasmiderwerbs wurde das Wachstumsverhalten von Plasmid-tragenden mit Plasmid-freien Stämmen verglichen. Isolate, die initial eine Fitnesslast oder einen Fitnessgewinn zeigten, wurden langzeitkultiviert, um adaptive Prozesse an die transferierten Plasmide hervorzurufen. Im Anschluss wurden für ausgewählte Isolate die Anpassungsmechanismen auf genetischer Ebene durch Ganzgenomanalysen untersucht (**Abbildung 9**).

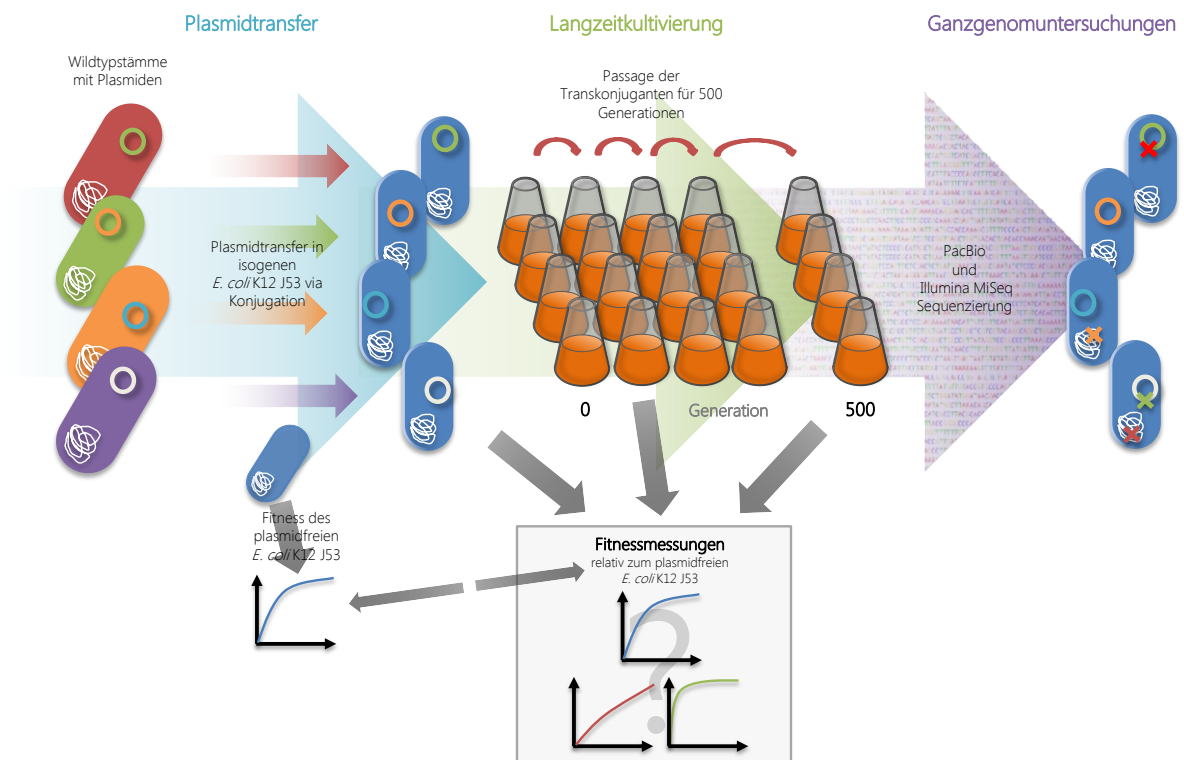


Abbildung 9: Arbeitsschema der Fitnessuntersuchungen.





## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

In **Tabelle 2** sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
BioPhotometer plus	Eppendorf AG
Concentrator Plus	Eppendorf AG
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Elektrophoresespannungsquelle PowerPack Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Fluorometer Qubit 3.0	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Geldokumentation GelDoc XRS	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Inkubator Incucell	MMM Group
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus GmbH
Mikrowelle Severin	CARL ROTH GmbH & Co. KG
MiSeq Systems	Illumina, Inc.
Multipipette Research pro	Eppendorf AG
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pipetten Reference variabel	Eppendorf AG
Plattenlesegerät Bioscreen C	Oy Growth Curves Ab Ltd
Plattformschüttler HeidolphPolymax 1040	neolab GmbH
Plattformschüttler MaxQ 6000	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pulsfeldgelelektrophorese Chef-DRIII System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pulsfeldgelelektrophorese Cooling Module	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pulsfeldgelelektrophorese Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pulsfeldgelelektrophorese Variable Speed Pump	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Reinstwasser Destillationssystem MilliQ Advantage A10	Merck KGaA
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermaldrucker Mitsubishi P93D	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermocycler Tgradient	Biometra GmbH
ThermocyclerGeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
ThermoMixer C/F1.5	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Mini Centrifuge	Nippon Genetics Europe GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortexer IKA Works (Agilent-Chip-Adapter)	IKA Works, Inc.
Waage Kern 440-43N	Sartorius Lab instruments GmbH&Co KG
Wasserbad	GFLGmbH
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® A10	Merck KGaA
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf AG
Zentrifuge Z216MK	Hermle Labortechnik GmbH

### 2.1.2 Chemikalien

In **Tabelle 3** sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller ersichtlich.

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

Substanz	Hersteller
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	SERVA electrophoresis GmbH
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Ethanol 96 % denatured; $\geq 96$ % (EtOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol; $\geq 99,8$ %, p.a. (EtOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Gene Ruler 100 bp (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Gene Ruler 1kb Ladder plus (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Isopropanol; mol. biology grade	SERVA electrophoresis GmbH
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
$\text{Na}_2$ -EDTA	SERVA electrophoresis GmbH
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	VEB Sprengstoffwerk Schönebeck
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Nukleasefreies Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Sarcosyllösung	SERVA electrophoresis GmbH
SeaKem Gold Agarose	Lonza AG
Thioharnstoff	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Tris-HCL	Merck KGaA

### 2.1.3 Enzyme

In **Tabelle 4** sind die verwendeten Enzyme mit Funktion und ihre Hersteller ersichtlich.

**Tabelle 4: Verwendete Enzyme**

Funktion	Produkt	Aktivität	Hersteller
Endopeptidase	Proteinase K	$\geq 30$ units/mg	Merck KGaA
Lysozym	Lysozym aus Hühnereiweiß; lyophilisiertes Proteinpulver $\geq 90$ %	$\geq 40,000$ units/mg	Merck KGaA
Nuklease	S1 Nuklease	100 units/ $\mu\text{l}$	Thermo Fisher Scientific, Inc.
	XbaI	50 units/ $\mu\text{l}$	Thermo Fisher Scientific, Inc.
RNase	RNase A	7000 units/ml	QIAGEN GmbH

### 2.1.4 Chemotherapeutika

In **Tabelle 5** sind die im Mikrobouillon-Verdünnungstest verwendeten Chemotherapeutika, deren maximale eingesetzte Konzentration, Lösungsmittel und Hersteller aufgeführt.

**Tabelle 5:** In MHK-Mikrobouillon verwendete Chemotherapeutika

Substanz	Lösungsmittel	Max. Konzentration [mg/L]	Hersteller
Amikacin (AMK)	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Ampicillin (AMP)	ddH <sub>2</sub> O	16	Sigma-Aldrich GmbH
Cefotaxim (CTX)	ddH <sub>2</sub> O	16	Sanofi-Aventis GmbH
Cefoxitin (FOX)	ddH <sub>2</sub> O	32	Sanofi-Aventis GmbH
Cefotiam (CTM)	ddH <sub>2</sub> O	8	Grünenthal GmbH
Ceftazidim (CAZ)	ddH <sub>2</sub> O	16	Sanofi-Aventis GmbH
Chloramphenicol (CMP)	EtOH (96 %)	32	Sigma-Aldrich GmbH
Ciprofloxacin (CIP)	HCl (0,1 M)	64	Fuka Chemie GmbH
Gentamicin (GEN)	ddH <sub>2</sub> O	8	Sanofi-Aventis GmbH
Kanamycin (KAN)	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Mezlocillin (MEZ)	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Nalidixinsäure (NAL)	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Oxytetracyclin (OTE)	HCl (0,1 M)	8	Sigma-Aldrich GmbH
Streptomycin (STR)	ddH <sub>2</sub> O	64	Sigma-Aldrich GmbH
Sulbactam	ddH <sub>2</sub> O	8	Sanofi-Aventis GmbH
Sulfmethoxazol/Trimethoprim (SXT)	NaOH (0,1 M)/DMF	128	Sigma-Aldrich GmbH
Meropenem (MEP)	ddH <sub>2</sub> O	8	Sigma-Aldrich GmbH
Colistin (COL)	ddH <sub>2</sub> O	32	Mast Diagnostics GmbH

### 2.1.5 Kits

Folgende, in **Tabelle 6** aufgeführte, kommerzielle Kits wurden für molekularbiologische Verfahren verwendet.

**Tabelle 6:** Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Inc.
BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc.
Cryobank™ Kryoröhrchen	Mast Diagnostica GmbH
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X	Thermo Fisher Scientific Inc.
DreamTaq PCR Master Mix 2x	Thermo Fisher Scientific Inc.
Genomic Tips G100	QIAGEN GmbH
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina, Inc.
Nextera® DNA Library Preparation Kit	Illumina, Inc.
Nextera® Index Kit	Illumina, Inc.
Plasmid Mini Kit 100	QIAGEN GmbH
PRBT Kit	Diatheva
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.

### 2.1.6 Medien und Lösungen

Die in **Tabelle 7** aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden am Robert Koch-Institut vom Labor für Nährmedien hergestellt. Soweit nicht anders angegeben handelt es sich um Fertigmedien.

**Tabelle 7: Verwendete Nährmedien und Lösungen**

Nährmedium	Hersteller
Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar	Oxoid GmbH
Brain-Heart-Infusion (BHI) Bouillon	Becton, Dickinson & Co.
Gallsäure-Chrysoidin-Glycerol-(GCG)-Selektions Agar	Sifin Diagnostics GmbH
Luria-Bertani (LB) Agar	Laboratories CONDA S.A.
Luria-Bertani (LB) Bouillon	Laboratories CONDA S.A.
Müller-Hinton (MH) Agar	Oxoid GmbH
Müller-Hinton (MH) Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH
Nährbouillon	Becton, Dickinson & Co.

Lösungen	Zusammensetzung
10x Tris-Borat EDTA-Puffer (TBE)	890 mM Tris 20 mM EDTA 890 mM Borsäure
Ladepuffer für Agarosegele	40 mg Na <sub>2</sub> -EDTA 4 g Saccharose 3 mg Bromphenolblau Add 10 ml ddH <sub>2</sub> O
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 mg/ml

### 2.1.7 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete PCR-Primerpaare.** Die Primerkonzentration für Multiplex-Applikationen ist, falls verwendet, angegeben.

Primer	T <sub>a</sub> [°C]	nM Multiplex	Produkt [bp]	Sequenz 5'-->3'	Referenz
adk fwd	54		583	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	Wirth <i>et al.</i> (77)
adk rev				CCGTCAACTTTCGCGTATTT	
ampC fwd	58		169	CTACGGTCTGGCTGCTA	Nelson <i>et al.</i>
ampC rev				TGGAGCAAGAGGCGGTA	(142)
blaVIM fwd	55		216	AGTGGTGAGTATCCGACAG	Miriagou <i>et al.</i>
blaVIM rev				ATGAAAGTGCGTGGAGAC	(143)
ChuA fwd	55	200	279	GACGAACCAACGGTCAGGAT	Clermont <i>et al.</i>
ChuA rev				TGCCGCCAGTACCAAAGACA	(72)
CITM fwd	60		462	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	Pérez-Pérez <i>et al.</i>
CITM rev				TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	(144)
CTX-M universal fwd	55	267	551	CGCTTTCGATGTGCAG	Gröbner <i>et al.</i>
CTX-M universal rev				ACCGCGATATCGTTGGT	(145)
CTX-M-9 MP fwd	55	200	356	GCAGTACAGCGACAATACCG	Gröbner <i>et al.</i>
CTX-M-9 MP rev				TATCATTGGTGGTGCCGTAG	(145)

Primer	T <sub>a</sub> [°C]	nM Multiplex	Produkt [bp]	Sequenz 5'-->3'	Referenz
fumC fwd	54		806	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	Wirth <i>et al.</i> (77)
fumC rev				GTACGCAGCGAAAAAGATTC	
gndbis fwd	59		300	ATACCGACGACGCCGATCTG	Johnson <i>et al.</i> (146)
rfbO25b rev				TGCTATTCAATTATGCGCAGC	
gndbis fwd	59		450	ATACCGACGACGCCGATCTG	Johnson <i>et al.</i> (146)
rfbO16 rev				GGATCATTTATGCTGGTACG	
gyrB fwd	60		911	TCGGCGACACGGATGACGGC	Wirth <i>et al.</i> (77)
gyrB rev				ATCAGGCCTTCACGCGCATC	
icd fwd	54		878	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	Wirth <i>et al.</i> (77)
icd rev				GGACGCAGCAGGATCTGTT	
KPCu fwd	58		533	CAGCTCATTTCAAGGGCTTTC	Gröbner <i>et al.</i> (145)
KPCu rev				AGTCATTTGCCGTGCCATAC	
mcr-1 fwd	58		309	CGGTCAGTCCGTTTGTTT	Liu <i>et al.</i> (147)
mcr-1 rev				CTTGGTCGGTCTGTAGGG	
mdh fwd	60		932	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGG	Wirth <i>et al.</i> (77)
mdh rev				CGG TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCT TTCTT	
OXA-48 fwd	58		555	AAATCACAGGGCGTAGTTGTG	Gröbner <i>et al.</i> (145)
OXA-48 rev				GACCCACCAGCCAATCTTAG	
purA fwd	54		816	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	Wirth <i>et al.</i> (77)
purA rev				CATACGGTAAGCCACGCAGA	
recA fwd	58		780	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	Wirth <i>et al.</i> (77)
recArev				TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	
SHV MP1 fwd	55	267	750	TTCGCCTGTGTATTATCTCC	Gröbner <i>et al.</i> (145)
SHV MP1 rev				TCCGCTCTGCTTTGTTATTC	
TEM universal fwd	55	535	851	ATGAGTATTCAACATTTCCG	Gröbner <i>et al.</i> (145)
TEM universal rev				TTAATCAGTGAGGCACCTAT	
TspE4C fwd	55	267	152	GAGTAATGTGCGGGGCATTCA	Clermont <i>et al.</i> (72)
TspE4C rev				CGCGCCAACAAAGTATTACG	
Yja fwd	55	400	211	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	Clermont <i>et al.</i> (72)
Yja rev				ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	

## 2.1.8 Software und Skripte

In dieser Arbeit verwendete Software und Onlinetools sind **Tabelle 9** aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Software und Onlinetools**

Software/Datenbanken	Firma/Entwickler/Referenz	Verwendungszweck
2100 Expert Software B.02.08.SI648 (SR2)	Agilent Technologies, Inc.	DNA Qualitätsanalyse
A5-miseq 0.0.9 beta	Coil <i>et al.</i> 2015 (148)	Assembly von MiSeq Sequenzreads
BioScreener SW	Oy Growth Curves Ab Ltd	Bioscreen C Steuersoftware
BLAST+ 2.3.0	Altschul <i>et al.</i> 1990 (149)	Paarweiser Sequenzvergleich
BWA-SW 0.7.15-r1140	Li <i>et al.</i> 2010 (150)	Read Mapping
CorelDRAW x6 16.2.0.998	Corel Corp.	Grafikprogramm
Easyfig 2.2.2	Sullivan <i>et al.</i> 2011 (151)	Visualisierung paarweiser Sequenzvergleiche
EnteroBase	<a href="http://enterobase.warwick.ac.uk">http://enterobase.warwick.ac.uk</a>	<i>E. coli</i> Genomdatenbank
FastQC	Babraham Bioinformatics Group	Qualitätskontrolle von Illumina-Reads
Geneious 10.0.5	Biomatters Ltd.	Framework und Sequenzmanager
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Geldokumentation

Software/Datenbanken	Firma/Entwickler/Referenz	Verwendungszweck
ISfinder	Siguier <i>et al.</i> 2006 (152)	IS Datenbank
iTOL 3.5.4	Letunic <i>et al.</i> 2016 (153)	Visualisierung phylogenetischer Bäume
Mauve 2.3.1 (Geneious framework)	Darling <i>et al.</i> 2004 (154)	Ganzgenom-Alignment
MLST 1.8	Larsen <i>et al.</i> 2012 (155)	Identifizierung der <i>E. coli</i> MLST aus NGS Daten
Notepad++ 7.5.1	<a href="https://notepad-plus-plus.org">https://notepad-plus-plus.org</a>	Texteditor
Nucleotide collection (nr/nt)	National Center for Biotechnology Information	Referenzdatenbank für BLAST Analysen
PlasMapper (Geneious framework)	Dong <i>et al.</i> 2004 (156)	Genomannotation
PlasmidFinder 1.3	Caratolli <i>et al.</i> 2014 (157)	Identifizierung von Plasmidreplikons aus NGS Daten
pMLST 1.4	Caratolli <i>et al.</i> 2014 (157)	Identifizierung von pMLST aus NGS Daten
Primer3 2.3.7 (Geneious framework)	Rozen <i>et al.</i> 2000 (158)	Primerdesign
RAST Server	Aziz <i>et al.</i> 2008 (159)	Genomannotation
RAxML 8.2.7 (Geneious framework)	Stamatakis <i>et al.</i> 2014 (160)	Maximum-Likelihood Tree Berechnung
refRank 1.0	Becker <i>et al.</i> 2018 (161)	Referenzidentifizierung
ResFinder 2.1	Zankari <i>et al.</i> 2012 (162)	Identifizierung von Antibiotika-resistenzgenen aus NGS Daten
Ridom SeqSphere+ 4.0.1	Ridom GmbH (85)	
SAMtools mpileup	Li <i>et al.</i> 2011 (163)	Alignmentverarbeitung
SNPfilter 2.2.0	Becker <i>et al.</i> 2018 (161)	SNP Detektion
SPAdes		Assembly von MiSeq Sequenzreads
Trimmomatic 0.0.9	Bolger <i>et al.</i> 2014 (164)	Read Trimming
VarScan 2.3	Koboldt <i>et al.</i> 2012 (165)	Variant Calling
VirulenceFinder 1.5	Joensen <i>et al.</i> 2014 (166)	Identifizierung von <i>E. coli</i> Virulenzfaktoren aus NGS Daten

### 2.1.9 Sequenziertechnologien und -plattformen

Für die Untersuchung der Fragestellungen wurden verschiedene Sequenziertechnologien eingesetzt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Sequenziertechnologien

Technologie	Plattform	Hersteller	Anbieter
Sanger-Sequenzierung	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	RKI Berlin GATC Biotech AG ( <i>lightrun96</i> )
Illumina <i>paired end</i>	MiSeq	Illumina Inc.	RKI Wernigerode LGC BfR Berlin
Einzelmolekülsequenzierung	PacBio RS II	Pacific Biosciences	GATC Biotech AG

Die Sanger-Sequenzdaten wurden zum größten Teil am RKI Berlin in der Abteilung MFS2 durchgeführt. 400 Sequenzierungsansätze für die MLST Typisierung der ESBL *E. coli* Populationsstudie wurden durch den

Dienstleister GATC bearbeitet. Ganzgenomsequenzierungen wurden mittels der Illumina *paired end* Technologie und Einzelmolekülsequenzierung durchgeführt.

### 2.1.10 Bakterienisolate

#### ESBL *E. coli* Populationsstudie

Die Isolate der ESBL *E. coli* Populationsstudie wurden in Zusammenarbeit mit Laborpartnern der Limbach-Labor Gruppe, dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) und dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité im Rahmen der Dissertation von Herrn Christoph Eller gesammelt (11, 105, 138). Es wurden *E. coli* Isolate aus ambulanten (n=105, meist ambulante Harnwegsinfektionen) und nosokomialen (n=127, > 48-72 h nach Klinikaufnahme isoliert) Hintergrund (Limbach-Labor-Gruppe), aus einer Fall-Kontroll-Studie der Charité (n=84), sowie aus einer, am LGL durchgeführten, Screening-Studie mit 3 344 gesunden Probanden aus der Allgemeinbevölkerung (n=141) miteingeschlossen. Kriterium für die Aufnahme in die Studie waren Resistenz gegenüber Cefotaxim und/oder Ceftazidim und/oder ein bestätigter ESBL Phänotyp. Die in dieser Arbeit typisierten Stämme sind in **Tabelle A-1** ersichtlich.

#### CMY-2 Studie

Es wurden 164 CMY-2 produzierende *E. coli* Isolate aus Deutschland, gesammelt in den Jahren 2008 - 2016, in die Studie eingeschlossen. Der Großteil der Isolate (n=149) wurde von verschiedenen Projektpartnern (Robert Koch-Institut, RKI; Bundesamt für Risikobewertung, BfR; Friedrich Löffler-Institut, FLI; Freie Universität Berlin, FU) im Rahmen des RESET Forschungsverbundes gesammelt. Die Isolate wurden im Rahmen verschiedener Studien identifiziert und stammten von gesunden Nutztieren, erkrankten Nutztieren, Lebensmittelproben und Patienten. Da keine direkte Beprobungsstrategie entwickelt wurde, handelt es sich um eine Sammlung zufällig gewonnener Studienisolate. Die Isolate wurden von den Projektpartnern mit Hilfe harmonisierter Methoden auf phylogenetische und genotypische Marker (phylogenetische Gruppe, Antibiotikaempfindlichkeitstestung, ESBL/AmpC Gentypisierung) vortypisiert.

Vom Projektpartner FU wurden 50 CMY-2 produzierende *E. coli* Isolate von Huhn (2009: n=9, 2012: n=28), Pute (2012: n=1, 2014: n=3), Schwein (2011: n=6, 2012: n=2) und Rind (2012: n=1) bereitgestellt. Die Isolate wurden im Rahmen verschiedener longitudinaler und Querschnittsstudien von verschiedenen Farmen isoliert (113, 141, 167-169). Sofern phylogenetische und genotypische Marker identisch waren, wurde nur ein Isolat pro Farm in die CMY-2 Studie eingeschlossen.

Das BfR stellte 63 CMY-2 produzierende *E. coli* Isolate zur Verfügung. Diese wurden in einer Querschnittsstudie mit dem Fokus auf ESBL/AmpC produzierende *E. coli* in Deutschland gesammelt. Im

Rahmen der Studie wurden zwischen 2011 - 2013, von Landeslaboren in Hessen, Niedersachsen und Bayern, 2 500 Lebensmittelproben verschiedener Herkunft und Matrices gesammelt und von diesen ESBL/AmpC produzierende *E. coli* isoliert. Die Isolate stammten von Hühnerfleisch (n=53), Putenfleisch (n=7) und Schweinefleisch (n=3).

Zusätzlich wurden am FLI fünf CMY-2 produzierende *E. coli* von erkrankten Nutztieren (Huhn n=3, Schwein n=1, Rind n=1) aus den Jahren 2008 - 2015, die im GERM-Vet Programm identifiziert wurden, in die Studie eingeschlossen (170).

Am RKI wurden 46 *E. coli* Isolate aus klinischen Proben vom Menschen in den Jahren 2008 bis 2016 gesammelt. Die Isolate stammten aus verschiedenen Studien oder wurden zur Routinetypisierung eingesandt (11, 105).

Die in dieser Arbeit untersuchten Isolate sind in **Tabelle A-2** aufgeführt.

### **Fitness Studie**

Für die Fitness Studie wurden vortypisierte Isolate ausgewählt, welche erfolgreiche Plasmid- oder ESBL-, AmpC- und Carbapenemasegen- Varianten trugen. Die ausgewählten Isolate stammen aus Routineeinsendungen an das RKI und der ESBL *E. coli* Populationsstudie. Details zu den verwendeten Isolaten sind in **Tabelle A-5** ersichtlich.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Übernachtskultur und Bakterienkultivierung

Die erste Anzucht der Bakterienisolate erfolgte, soweit nicht anders angegeben, auf Müller-Hinton Agarplatten mit 3 % Schafblut (Blut-MH-Agarplatte). Nachfolgende Kultivierungen erfolgten entweder auf Blut-MH-Agarplatten oder auf LB-Agarplatten. Die Inkubation der Platten wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die Lagerung inkubierter Platten erfolgte kurzzeitig bei 4°C.

Für den Ansatz einer Übernachtsflüssigkultur wurden einige wenige Kolonien des gewünschten Stammes von einer frisch inkubierten LB- oder Blut-MH-Agarplatte entnommen und in 5 ml sterilen Nähr-Bouillon überführt. Die Inkubation erfolgte für 14-18 h bei 37 °C und 140 rpm.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung

Die Konservierung der Bakterienstämme erfolgte mittels Cryobank Kryoröhrchen (Mast Diagnostica GmbH). Die Beimpfung der Röhrchen erfolgte mit Bakterien einer frischen Reinkultur nach Herstellerangaben. Die langfristige Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80 °C.

#### 2.2.1.3 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung

Die antimikrobiellen Empfindlichkeitstestungen dieser Studie wurden mittels des Mikrobouillondilutionsverfahrens in Mikrotiterplatten zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) durchgeführt. Die MHK wird durch die niedrigste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz bei der kein Wachstum mehr erfolgt definiert. Die Vorgehensweise ist standardisiert und erfolgte nach EUCAST Kriterien ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints; v7.1.](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints; v7.1.)). Die getesteten Antibiotika sind in ihrer maximal eingesetzten Konzentration in **Tabelle 5** und das Befüllungsschema der Mikrotiterplatten in **Abbildung A-1** ersichtlich. Die Einteilung und Interpretation in empfindliche bzw. resistente Isolate erfolgte nach den EUCAST Kriterien ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints; v7.1.](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints; v7.1.)).

#### 2.2.1.4 Konjugationsexperimente

Für Konjugationsexperimente wurde der Natriumazid-resistente Stamm *E. coli* K12 J53 als Rezeptorstamm verwendet. Konjugationsexperimente aller Studien wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Donor- und Rezipientenstamm wurden über Nacht bei 37°C in 10 mL Nährbouillon in Schüttelkultur angezogen. Anschließend wurden 100 µL des Rezipientenstamms und 900 µL des Donorstamms zusammen in 10 ml frischen Nährbouillon überimpft und über Nacht bei 37°C ungeschüttelt inkubiert. 20 µL der üN Kultur wurden auf eine LB-Agar Platte ausplattiert und für eine weitere Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser wurden vereinzelte potentielle Transkonjuganten auf eine frische LB-Agar Platte mit jeweiligem Selektionsmarker des Donors (Cefotaxim: 1 µg/ml; Cefoxitin: 10 mg/l; Ampicillin: 50 mg/l) und 200 mg/l Natriumazid (Selektionsmarker des Rezipienten) überimpft. Zusätzlich wurden die ausgewählten Transkonjuganten zur morphologischen Kontrolle auf einer GCG-Agar und MH-Blutagar Platte ausgestrichen.

Informationen zu den konjugierten Stämmen der Fitness Studie sind in **Tabelle A-5** im Anhang ersichtlich.

### **2.2.1.4.1 Molekularbiologische Überprüfung und Typisierung der Transkonjuganten**

Transkonjuganten wurden molekularbiologisch auf ihre erfolgreiche Konjugation überprüft. Zu diesem Zweck wurde die DNA extrahiert (siehe **Abschnitt 2.2.2.1.1**) und mittels PCR auf die Anwesenheit des Resistenzgens von Interesse und weiterer möglicher Resistenzgene vom Donorstamm (Primer siehe **Tabelle 8**) überprüft. Um fälschlicherweise mitgeführte Donorstämme auszuschließen wurde auf den phylogenetischen Marker *yjaA* von *E. coli* K12 J53 nach Clermont *et al.* getestet (72). Weiterhin wurde die plasmidische DNA der Transkonjuganten extrahiert (siehe **Abschnitt 2.2.2.1.3**) und die Replikontypen der transferierten Plasmide mit Hilfe des PRBT Kits (Diatheva) charakterisiert. Mittels Makrorestriktion (S1-Nuklease PFGE) wurden die Plasmidgrößen der Transkonjuganten und jeweiligen Wildtypisolate bestimmt (171).

### **2.2.1.5 Wachstumsversuche mit Transkonjuganten und Auswertung („Fitness Studie“)**

#### **2.2.1.5.1 Wachstumsversuche in Mikrowellplatten**

Zur Vorbereitung der Wachstumsuntersuchungen wurden die Stämme auf frische LB-Agar Platten überimpft und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden Einzelkolonien entnommen und bei 37 °C für 3 - 4 h in LB-Medium inkubiert. Für die Wachstumsuntersuchung wurde die Vorkultur auf  $5 \times 10^6$  CFU/ml in frischem, auf 37°C temperiertem LB-Medium eingestellt. Die Wachstumsmessung wurde parallelisiert im Bioscreen C MBR Photometer (Oy Growth Curves Ab Ltd) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden je 200 µL der Zellsuspension in Triplikaten in die Kavitäten einer 96well Honeycomb-Platte (Oy Growth Curves Ab Ltd) pipettiert. Auf jeder Platte wurden zur anschließenden Ermittlung der relativen Fitness Referenzstämme mitgeführt. Bei den eingesetzten Referenzstämmen handelte es sich um *E. coli*

K12 J53, sowie um die Transkonjuganten der jeweiligen mitgeführten Isolate der Generation  $G_0$ . Die Inkubation und Messung wurde im Bioscreen C Photometer (Oy Growth Curves Ab Ltd) bei 37°C für 20 h durchgeführt. Die optische Dichte  $OD_{600nm}$  wurde alle 10 min bestimmt. Vor jeder OD-Messung wurden die Bakteriensuspensionen durch kurzes Vortexen durchmixt. Die Ermittlung der Wachstumsrate und relativen Fitness erfolgte wie in **Abschnitt 2.2.1.5.4** erläutert.

#### 2.2.1.5.2 Wachstumsversuche in Schüttelkultur

Anhand der initialen Fitnesscharakterisierung wurden sieben Transkonjuganten mit charakteristischen Fitnessseffekten (102/04 K1, 102/04 K2, 252/09 K2, 104/15 K3, RS165 K1, 151/09 K2, 346/12 K2) identifiziert. Um Wachstums-beeinflussende Effekte, bedingt durch die Messungen im Mikrowellformat, auszuschließen, wurden diese sieben Isolate zusätzlich 25 ml LB-Medium –Ansätzen in Erlenmeyerkolben untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien aus einer üN Vorkultur in 25 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben überimpft und dabei auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,05 eingestellt. Die Inkubation wurde bei 37 °C bei 140 rpm in einem Schüttelinkubator durchgeführt. Die Messung der Zelldichte ( $OD_{600nm}$ ) erfolgte alle 30 min bis zum Erreichen der stationären Phase. Die Ermittlung der Wachstumsrate und relativen Fitness erfolgte wie in **Abschnitt 2.2.1.5.4** erläutert.

#### 2.2.1.5.3 Langzeitwachstumsversuche

Anhand der initialen Fitnesscharakterisierung wurden sieben Transkonjuganten mit charakteristischen Fitnessseffekten (102/04 K1, 102/04 K2, 252/09 K2, 104/15 K3, RS165 K1, 151/09 K2, 346/12 K2) identifiziert, die im Anschluss über mehrere Generationen kultiviert und auf mögliche Fitnesslastkompensationseffekte untersucht werden sollten.

Die Langzeitkultivierung wurde wie folgt durchgeführt:

Für das initiale Inokulum der Langzeitkultivierung wurde eine frische üN Einzelkolonie einer jeweiligen Transkonjugante in 5 ml LB-Medium eingerieben und bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 140 rpm inkubiert. Nach ca. 24 h wurden 10 µl der Bakteriensuspension in 5 ml frisches LB-Medium überführt und abermals für 24 h inkubiert. Die Kultivierung wurde über 500 Generationen durchgeführt. Ein Animpfvolumen von 10 µl führte zu einem Zuwachs von 8,96 Generationen pro Passage (24 h).

Die passagierten Stämmen wurden alle 100 Generationen beprobt und kryokonserviert. Kulturen der Generationen  $G_{200}$  und  $G_{500}$  wurden auf mögliche Änderungen in ihrer Fitness und auf ihre antimikrobielle Empfindlichkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension in einer Verdünnung von  $10^{-6}$  je auf eine LB-Agar und eine, das jeweilige Antibiotikum enthaltende LB-Agar-Platte (FOX, AMP) ausplattiert. Von der Antibiotikum-enthaltenden Platte wurden je vier Kolonien pro Generation ausgewählt und auf ihre Fitnessseigenschaften durch Wachstumsmessungen, der Überprüfung der MHK und der Anwesenheit des Resistenzgens untersucht.

#### 2.2.1.5.4 Auswertung der Wachstumsexperimente

Die erhaltenen Messergebnisse des Plattenreaders wurden mit Microsoft Excel 2010 ausgewertet.

Zur Bestimmung der relativen Fitness wurde die Wachstumsrate in der exponentiellen Phase als Fitnessparameter eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden zunächst mit Hilfe von Formel [1] die Wachstumsraten  $\mu_{tx}$  (Zeitpunkt x) für alle konsekutiven Messpunkte bestimmt.

$$\mu_{tx} = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1}$$

mit  $OD_1$  bei  $t_1$  und  $OD_2$  bei  $t_2$

Die exponentielle Wachstumsphase wurde anhand einer initialen Versuchsreihe mit dem plasmidfreien Rezipienten *E. coli* K12 J53 ermittelt (**Abbildung A-6**). Für die vorliegenden Versuchsbedingungen wurde ein Threshold von  $\mu_{tx} \geq 0,5 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  als exponentielles Wachstum definiert. Um Messfehler oder Ausreißer außerhalb der exponentiellen Wachstumsphase auszuschließen, wurde die zusätzliche Bedingung definiert, dass  $\mu_{tx}$  bei  $t_x$  nur dann der exponentiellen Phase zugeordnet wird, wenn  $\mu_{tx-1}$  bei  $t_{x-1}$  und/oder  $\mu_{tx+1}$  bei  $t_{x+1}$  ebenfalls oberhalb des Thresholds liegen. Die Wachstumsrate  $\mu$  für die gesamte exponentielle Phase wurde im Anschluss durch den Mittelwert aller die Bedingungen erfüllenden und oberhalb des Thresholds liegenden Wachstumsraten  $\mu_{tx}$  ermittelt. Die jeweiligen Triplikate eines Isolates wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

Mit Hilfe der Wachstumsrate  $\mu$  wurde die relative Fitness eines jeweiligen Isolates im Vergleich zum Rezipienten, Konjugaten der verschiedenen Generationen oder Wildtypstamm berechnet.

$$\text{Wachstumsrate [\%]} = \frac{\text{Wachstumsrate } \mu_{\text{Transkonjugant}}}{\text{Wachstumsrate } \mu_{\text{E.coli K12 J53 plasmidfrei}}} \times 100$$

Als Referenzfitness wurden die Wachstumsraten von *E. coli* K12 J53, der Wildtyp- oder  $G_0$ -Isolate herangezogen. Abweichungen zu diesen Wachstumsraten ergaben den relativen Fitnessverlust/Gewinn in Prozent [%]. Alle Messungen wurden mindestens in biologischen Triplikaten durchgeführt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Extraktion von DNA

Abhängig der geplanten Analysemethode variierten die benötigten Qualitätsparameter der DNA und dahingehend auch die Extraktionsmethode:

#### 2.2.2.1.1 - für PCR-Anwendungen

Für PCR-Anwendungen wurde keine hochreine DNA benötigt. Daher wurde sogenannte „Koch-DNA“ extrahiert (172). Einige wenige Kolonien eines Stammes wurden in 100 µL ddH<sub>2</sub>O suspensiert und für 10 min bei 97 °C inkubiert. Durch abschließende Zentrifugation wurde die DNA im Überstand gewonnen, welche für PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.1.2 - für Ganzgenomsequenzierungen

Für Ganzgenomsequenzierungen wurde DNA höherer Reinheit benötigt. Die DNA-Extraktion für die Illumina MiSeq Sequenzierung wurde daher mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen GmbH) nach Herstellerangaben für Gram-negative Bakterien durchgeführt. Ein zusätzlicher RNA-Verdau durch RNase A (100 mg/mL) (Quiagen GmbH) wurde an entsprechender Stelle im Protokoll durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mittels ddH<sub>2</sub>O. Im Anschluss an die Extraktion wurde die Qualität der DNA photometrisch mittels Eppendorf BioPhotometer und die DNA-Konzentration anhand eines QuBit 4 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific, Inc.) mit einem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) ermittelt.

Da bei der Einzelmolekülsequenzierung eine optimale DNA-Qualität (OD<sub>260/280</sub> Ratio 1,8 - 2,0 und OD<sub>260/230</sub> Ratio 2,0 - 2,2) und lange DNA-Fragmente benötigt werden, wurde die DNA mittels Genomic-tip 100/G Kit (Quiagen GmbH) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution der DNA erfolgte in TE Puffer. Die DNA-Fragmentgröße wurde auf einem 0,9 % Agarosegel kontrolliert und die DNA-Qualität, sowie -Konzentration mittels Eppendorf BioPhotometer und QuBit 4 bestimmt.

Die DNA beider Extraktionsverfahren wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.1.3 - plasmidischer DNA

Die Extraktion plasmidischer DNA erfolgte mit dem Plasmid Mini Kit (Quiagen GmbH) nach Herstellerangaben. Die Überprüfung des Extraktionsprodukts erfolgte auf einem 0,9 %igen Agarosegel (80 V, 3 h). Als Größenstandard wurden die Plasmid der *E. coli* Stämme V517 und *E. coli* K-12 R222 verwendet (173, 174). Die plasmidische DNA wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine Methode zur Auftrennung großer DNA-Fragmente, die beispielsweise zur Typisierung von bakteriellen Genomen oder Plasmiden verwendet wird. Im Gegensatz zur klassischen Gelelektrophorese wird bei der PFGE ein alternierendes elektrisches Feld angelegt. Der periodische Wechsel des Spannungsfelds ermöglicht eine Auftrennung großer DNA-Fragmente (bis hin zu mehreren Megabasen (Mb)). Die für die PFGE benötigten DNA-Fragmente werden durch anwendungsspezifische Restriktions-Endonukleasen erzeugt. Zur Plasmidgrößenbestimmung wurde die plasmidische DNA mit S1-Nuklease verdaut. Die S1-Nuklease schneidet Plasmide einfach, linearisiert diese damit und ermöglicht daher eine nicht durch verschiedene Konformationszustände der Plasmide beeinflusste Größenanalyse der Plasmide.

Die Immobilisierung der DNA während des Restriktionsverdau erfolgt durch die Aufnahme der DNA in Agaroseblöckchen. Die Durchführung erfolgte nach Barton *et al.* (171). Die in dieser Arbeit aufgeführten S1-Nuklease PFGE wurden von Fr. Sibylle Müller-Bertling und Fr. Kirstin Ganske durchgeführt.

#### Herstellung der Agaroseblöckchen:

Die zu untersuchenden Bakterien wurden bei 37 °C über Nacht auf Müller-Hinton-Agarplatten inkubiert. Anschließend wurden Bakterien im Zellsuspensions-(CSB)-Puffer suspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,44 eingestellt. Zu 300 µl CSB-Bakteriensuspension wurden 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) hinzugegeben und für 12 min bei 37 °C inkubiert. Für die Herstellung der Flüssigagarose für die Blöckchen wurden 56 mg Sea Kem Gold Agarose (Lonza AG) mit 5 ml TE-Puffer und 270 µl 20 % SDS-Lösung gemischt. Zur Bakteriensuspension wurden 315 µl der Flüssigagarose hinzugegeben und in die Blöckchenform gegossen. Im Anschluss wurden die Blöckchen mit 25 µl Proteinase K (20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Inc.) und 5 ml Lysepuffer für drei Stunden bei 56 °C im Wasserbad inkubiert und danach zweimal je 15 min mit 56 °C warmen ddH<sub>2</sub>O und anschließend je dreimal mit TE-Puffer gewaschen. Die Blöckchen wurden bei 4 °C in TE-Puffer aufbewahrt.

Benötigte Puffer:

Cell Suspension Buffer (CSB)	Lysepuffer	Laufpuffer
100 nM Tris	25 ml 1M Tris pH 8	5,4 g Tris
100 nM EDTA	50 ml 0,5M EDTA pH 8	2,75 g Borsäure
pH 8	50 ml 10% Sarcosyllösung	0,365 g EDTA
	Ad 500 ml H <sub>2</sub> O	ad 1 l H <sub>2</sub> O
		750 µl 1% Thioharnstoff-Lösung
		ph 8,5

### Restriktionsverdau mit *S1*-Nuklease

Die Blöckchen wurden für 30 min mit 2 ddH<sub>2</sub>O und 500 µl Puffer bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend erfolgte der Verdau der DNA bei 37 °C für 45 min durch Zugabe von 0,7 µl *S1*-Nuklease (100 U/µl, (Thermo Fisher Scientific, Inc.)), 18,6 µl *S1* Nuclease Reaction Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) und 73,6 ml ddH<sub>2</sub>O. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1:10 verdünntem Blue Juice (Thermo Fisher Scientific, Inc.) gestoppt. Im Anschluss wurden die Agaroseblöckchen auf einem Gelkamm fixiert und in ein 1%iges Agarosegel eingebettet. Die Auftrennung erfolgte in einer mit Laufpuffer-Puffer und Thioharnstoff befüllten PFGE-Kammer.

### Laufbedingungen

- Pulszeiten: 1 s Initialzeit/25 s Finalzeit
- Startratio: 1
- Spannung: 6 V/cm
- Stromstärke: 140 mA
- Laufzeit 21 h; Winkel 120°

Als Fragmentgrößenstandard wurde auf dem Agarosegel der *Salmonella enterica* Braenderup Stamm H9812 mitgeführt, welcher mittels des Restriktionsenzym *XbaI* fragmentiert wurde.

Für den Restriktionsverdau mit *XbaI* wurden die Blöckchen für 30 min 20 µl Tango Puffer und 180 µl ddH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur equilibriert. Der Verdau erfolgte unter Zugabe von 2 µl *XbaI* Enzym (50 U/µl, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 20 µl Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) und 178 µl ddH<sub>2</sub>O für 3 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1:10 verdünntem Blue Juice (Thermo Fisher Scientific, Inc.) gestoppt. Das Blöcken wurde, wie zuvor beschrieben, zusammen mit den *S1*-Nuklease verdauten Blöckchen auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction - (PCR)). Die PCR wurde zum Nachweis spezifischer Nukleotidfragmente wie z.B. Antibiotikaresistenzgenen eingesetzt. **Tabelle 12** zeigt die in dieser Arbeit angewandten Standard PCR-Bedingungen. Die Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primerpaare sind in **Tabelle 8** ersichtlich. Der verwendete Standard-PCR-Ansatz ist in **Tabelle 11** aufgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (1,4 % Agarose) und anschließender Ethidiumbromid-Färbung überprüft.

**Tabelle 11: Standard PCR-Ansatz**

Reagenz	Menge
Dream Taq PCR Master Mix 2x	12,5 µl
Primer <sub>forward/reverse</sub>	je 200 nM
DNA	ca. 10 ng
Nukleasefreies ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Für Multiplex PCR wurden teilweise angepasste Primerkonzentrationen eingesetzt um bestmögliche Amplifikationsprodukte zu erhalten. Abweichungen sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 12: Standard PCR-Bedingungen**

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initialdenaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 30x
Primerannealing	T <sub>a</sub> (abhängig von Primer)	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	

#### 2.2.2.3.1 Bestimmung der phylogenetischen Gruppen von *E. coli*

Die Bestimmung der vier phylogenetischen Hauptgruppen (A, B1, B2, D) erfolgte in dieser Arbeit nach Clermont *et al.* (72). Die Anwesenheit der drei Sequenzabschnitte *chuA*, *yjaA* und TSPE4.C2 wurde dabei entweder PCR-basiert ermittelt oder aber aus Ganzgenomdaten extrahiert.

#### 2.2.2.3.2 Multi-Lokus-Sequenztypisierung (MLST)

Mit dieser Typisierungsmethode kann die Populationsstruktur von Bakterien durch die Untersuchung spezifischer Genfragmente analysiert werden. Grundlage der MLST bilden konservierte *housekeeping* Gene, die amplifiziert und sequenziert werden. Aufgrund von Punktmutationen innerhalb dieser Abschnitte ergeben sich spezifische Allelvarianten. Jede Allelkombination ergibt einen Sequenztyp (ST). In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund seiner größeren Verbreitung und besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studienergebnissen sowie der besten Wiedergabe der „echten“ *E. coli*-Phylogenie das Warwick Schema eingesetzt (80). Bei diesem Schema werden sieben Allele charakterisiert (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icdF*, *mdh*, *purA*, *recA*).

Die Durchführung der MLST mittels PCR erfolgte anhand des in **Tabelle 11** dargestellten Standard-PCR-Pipettierschema mit den jeweils allelspezifischen Primern (**Tabelle 8**) und des in **Tabelle 12** aufgeführten Standard-PCR-Temperaturprofils und den primerspezifischen Annealingtemperaturen. Die PCR-Produkte wurden wie in **Abschnitt 2.2.3.1** beschrieben sequenziert oder durch eine „lightrun96“ Sequenzierung



durch GATC Biotech AG (384 Sequenzieransätze) sequenziert. Die Auswertung der Allele zur Ermittlung des STs wurde auf <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/> durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von Sequenztypen von *E. coli* stellen Sequenztyp-spezifische PCRs dar. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Ermittlung von ST131 zwei spezifische PCRs, welche das ST131-spezifische *rfbO25b* und *rfbO16* Allel amplifizieren, eingesetzt (140, 146).

#### **2.2.2.3.3 Plasmid-Replikontypisierung (PRBT)**

Die Plasmid-Replikontypisierung ermöglicht die Typisierung von Plasmiden anhand ihrer spezifischen Replikonsequenzen. Zur Identifizierung der Replikontypen wurde ein kommerzielles, PCR-basiertes PRBT Kit (Diatheva) verwendet, welches auf den publizierten Primern von Carattoli *et al.* basiert (52). Die Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

### **2.2.3 Sequenziermethoden**

#### **2.2.3.1 Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung)**

Das von Sanger und Coulson 1977 entwickelte Sequenzierverfahren basiert auf der Didesoxymethode und wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt. Hierbei werden DNA Fragmente mit Hilfe einer bekannten Primersequenz mittels einer DNA-Polymerase linear verlängert. Neben Desoxyribonukleotiden (dNTPs) werden zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Das Fehlen der für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids benötigten Hydroxygruppe am 3'-C-Atom der ddNTPs führt zum Abbruch der Elongation. Die unterschiedlich langen Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die mittels Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs durch eine CCD-Kamera detektiert. Das so erstellte Elektropherogramm gibt die Abfolge der Basen des sequenzierten Strangs wieder.

##### **2.2.3.1.1 Probenvorbereitung zur Produktsequenzierung (Sanger)**

Als Ausgangsmaterial für die Sanger-Sequenzierung dienten PCR Produkte (**Abschnitt 2.2.2.3**). Die Probenvorbereitung zur Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) nach Herstellerangaben. Es wurde jeweils in 5' und 3' Richtung sequenziert, dementsprechend wurden für jede Probe zwei Sequenzieransätze mit je *Forward* und *Reverse* Primern vorbereitet. Die Kapillarelektrophorese wurde auf einem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific, Inc.) am RKI Berlin durch Abteilung MF2 durchgeführt.

Der 10 µl Sequenzierungsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Big Dye	1 µl
Primer <sub>forward/reverse</sub>	0,5 µl
PCR-Produkt	0,4 µl
Nukleasefreies ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die Amplifikation fand nach folgenden Bedingungen statt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initialdenaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	10 sec	} 25x
Primerannealing	T <sub>a</sub> (abhängig von Primer)	5 sec	
Elongation	60°C	4 min	

### 2.2.3.2 Illumina Ganzgenomsequenzierung

Bei der Illumina-Sequenzierung handelt es sich um ein Hochdurchsatzsequenzierverfahren, welches auf der *Sequencing by Synthesis* Methode basiert: Hierbei werden basenspezifische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt die zusätzlich als reversible 3' Terminatoren agieren und daher die Identifizierung einzelner Basen während des Einbaus in den DNA-Strang ermöglichen.

Da bei der Illumina-Sequenzierung nur kurze Fragmente amplifiziert und sequenziert werden, ist vor der Sequenzierung eine Fragmentierung der DNA notwendig. Anschließend werden die 3'-Enden der fragmentierten DNA an DNA-Oligonukleotid Adapter ligiert. Diese ermöglichen zum einen die Identifizierung der DNA-Fragmente während der Sequenzanalyse und werden zum anderen benötigt, um die DNA-Fragmente auf die *flow cell* zu binden, auf der die eigentliche Sequenzierung stattfindet. Im nächsten Schritt, der sogenannten *bridge amplification*, werden die auf der *flow cell* gebundenen DNA-Fragmente amplifiziert und die Amplifikationsprodukte erneut an die *flow cell* gebunden, wodurch Cluster identischer DNA Fragmente entstehen. In der folgenden Sequenzierreaktion werden nun die jeweiligen basenspezifischen mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen dNTPs an die DNA angelagert. Die Fluoreszenzfarbstoffe fungieren dabei als Terminator der Polymerisation. Hierdurch kann nach jedem Einbauzyklus die Intensität und der Fluoreszenzfarbstoff der inkorporierten Basen zur Identifikation herangezogen werden. Nach der Messung werden die Farbstoffe enzymatisch abgespalten und ermöglichen im nächsten Zyklus den Einbau einer weiteren Base.

Eine Variante dieser Sequenziertechnologie stellt die *paired-end*-Sequenzierung dar. Hierbei werden jeweils beide Enden der DNA Fragmente sequenziert, was je nach Fragmentgröße Zusatzinformationen zur Orientierung und Abstand der *Reads* zueinander liefert und eine verbesserte bioinformatische

Verarbeitung bei der Detektion von Repeat-Regionen, Rearrangements und Insertionen/Deletionen ermöglicht.

#### **2.2.3.2.1 MiSeq Library-Erstellung und Sequenzierung**

Die Vorbereitung der Isolate zur Sequenzierung am RKI erfolgte in der vorliegenden Studie nach dem Nextera XT DNA Library Preparation Kits (Illumina, Inc.) nach Herstellerangaben. Die Qualität der erstellten *libraries* wurde anhand einer Fragmentgrößenbestimmung und Quantifizierung mit dem Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Inc.) auf einem Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Inc.) und der Software 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Inc.) kontrolliert.

Die Sequenzierung erfolgte auf einem MiSeq System (Illumina, Inc.) unter Einsatz des MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina, Inc.) mit 2x300 bp *paired-end* Modus. Pro Probe wurden ca. 1500 pg *library* DNA eingesetzt.

#### **2.2.3.3 SMRT Sequencing (PacBio)**

Die *single molecule real time sequencing* (SMRT) stellt eine weitere *Sequence by Synthesis* Variante eines *Next Generation* Sequenzierverfahrens dar. Bei der SMRT Sequenzierung werden die einzelnen Basen eines DNA Moleküls in Echtzeit während der DNA Synthese detektiert. Grundlage bilden DNA-Polymerasen, welche am Boden von sogenannten ZMWs (*zero-mode wave-guides*), kleinen Well-ähnlichen Kavitäten, immobilisiert sind. Während der Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide in den komplementären DNA-Strang eingebaut. Die Inkorporation der Nukleotide bewirkt eine Abspaltung der Fluoreszenzfarbstoffe, dessen Signal erfasst wird und mit der entstehenden DNA-Sequenz korrespondiert. Der freie Fluoreszenzfarbstoff diffundiert anschließend aus der ZMW Kavität und kann nicht länger detektiert werden. Da im Unterschied zur Illumina-Sequenzierung keine fragmentierte DNA eingesetzt wird, können mit dieser Technologie *Read*-Längen von 20 kb und mehr erreicht werden. Zusätzlich ermöglicht die SMRT Sequenzierung über die Fluoreszenzkinetik die Detektion von Basenmodifizierungen, wie z.B. Methylierungen.

Die SMRT Sequenzierungen dieser Studie wurden von GATC Biotech AG durchgeführt. Die Probenvorbereitung (DNA Extraktion) erfolgte nach Vorgaben des Dienstleisters (siehe auch **Abschnitt 2.2.2.1.2**).

Im Folgenden werden die Ganzgenomsequenzierungen der verschiedenen Studien aufgeschlüsselt:

### **ESBL *E. coli* Populationsstudie:**

Insgesamt wurde 54 ESBL-positiven *E. coli* mittels Illumina MiSeq Ganzgenom-sequenziert (**Tabelle A-1**). Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Purelink Genome DNA Mini Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina MiSeq (Illumina, Inc.) mit Nextera XT DNA Library Preparation Kits (Illumina, Inc.) und dem MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina, Inc.) mit 2x300 bp *pairend-end reads*. Die Sequenzierung der Isolate erfolgte im Institut für medizinische Mikrobiologie an der Justus Liebig Universität Gießen (JLU).

### **CMY-2 Studie:**

Alle 164 *bla*<sub>CMY-2</sub> positiven *E. coli* Isolate wurden mit Hilfe der Illumina MiSeq Plattform (Illumina, San Diego, U.S.A.) sequenziert (**Tabelle A-2**).

Die DNA-Extraktion und Ganzgenomsequenzierung von 58 *E. coli* wurde am RKI nach den in **Abschnitten 2.2.2.1.2** und **2.2.3.2** erläuterten Methoden durchgeführt.

Von 44 Isolaten wurde die DNA mittels PureLink® Genomic DNA Kit (ThermoFisher Scientific) am BfR extrahiert und die Ganzgenomsequenzierung mittel Nextera XT DNA Library Preparation Kits (Illumina, Inc.) und MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina, Inc.) mit 2x300 bp *pairend-end reads* durchgeführt.

Die DNA-Extraktion und die Illumina MiSeq Sequenzierung von 62 *E. coli* Isolaten wurde vom Dienstleister LGC Genomics auf einem Illumina MiSeq unter Einsatz des MiSeq v3 Reagent Kits (Illumina, Inc.) mit 2x300 bp *pairend-end reads* durchgeführt.

### **Fitness Studie:**

Im Rahmen der Fitness Studie wurden zwei PacBio Sequenzierungen und sieben Illumina MiSeq Sequenzierungen durchgeführt (**Tabelle 28**). Die Illumina MiSeq Sequenzierungen erfolgten am RKI nach den **Abschnitten 2.2.2.1.2** und **2.2.3.2**. Die PacBio Sequenzierung wurde vom Dienstleister GATC Biotech AG durchgeführt.

## 2.2.4 Bioinformatische Prozesse

### 2.2.4.1 Read Qualitätskontrolle

Die Qualität der generierten Illumina Rohdaten wurde mit Hilfe des Programms *FastQC* (Babraham Bioinformatics Group) überprüft. Die Qualität der Rohdaten wurde durch das Herausfiltern oder Kürzen von *Reads* mit schlechten Qualitätsparametern verbessert. Mittels *Trimmomatic* wurden die Rohreads abhängig von ihrer Qualität, wenn nötig, gekürzt oder von den Analysen ausgeschlossen (*trimming*). Die Parameter wurden abhängig von der anschließenden Genomrekonstruktion gewählt (164): Für das *Read-Mapping* wurden der Trimming Parameter `slidingwindow 4:15` gewählt, während für die *de novo* Assemblierung bestimmten Rohdaten der Parameter `maxinfo 15:0.5` gewählt wurde. Bei allen weiteren Parametern handelte es sich um Standardeinstellungen. Die Qualität der getrimmten Reads wurde erneut mit *FastQC* überprüft.

Die Qualität der Rohdaten wurde anhand der PHRED-Scores bewertet. Die Rohdaten hatten einen durchschnittlichen PHRED-Wert von über 30. Die durchschnittliche *Read*-Qualität konnte durch den Trimmingprozess auf einen PHRED-Score von über 35 erhöht werden.

### 2.2.4.2 De novo Assemblierung

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Assemblierungsmethoden angewandt:

Die Illumina Ganzgenomdaten der CMY-2 Studie wurden mittels *A5-miseq* (v.0.0.9 beta; `default parameters`) assembliert. Durchschnittlich wurden die Genomdaten aller 164 Isolate in 213 Contigs mit einer mittleren Contiglänge von 39 455 assembliert (148).

Die Illumina Ganzgenomsequenzen der Fitness Studie wurden mittels *SPAdes* (v.3.10.1) assembliert (175). Die Illumina Ganzgenomdaten der ESBL *E. coli* Populationsstudie wurden an der JLU Gießen mit *SPAdes* (v.3.0) assembliert (105, 175).

Die PacBio Ganzgenomdaten wurden durch den Dienstleister GATC Biotech AG mittels der Software *HGAP* (v.3) assembliert. Die Assemblierung ergab pro Sequenzierung zwei Contigs; je ein Plasmid und Chromosom vollständig abdeckendes Contig. Die Zuweisung der Contigs als chromosomale oder plasmidale Sequenz erfolgte durch eine BLAST Analyse.

### 2.2.4.3 Read Mapping und SNP Identifizierung

Für die Mapping-basierte SNP-Analysen der CMY-2 Studie wurde zunächst für die zu untersuchenden Isolate eine geeignete Referenzsequenz ermittelt. Zu diesem Zweck wurde auf das Tool *refRank* zurückgegriffen (161). Das Tool aligniert eine zufällige Auswahl an *Reads* der zu analysierenden

Ganzgenomsequenzen gegen bereitgestellte Referenzgenome und ermittelt auf Grundlage der normalisierten und gemittelten Basenabdeckung der verschiedenen Referenzgenome eine Rangfolge für die bestmöglichen Referenzen. Es wurde auf 354 bei NCBI vorliegenden *E.coli* Ganzgenomsequenzen zurückgegriffen, welche zum Zeitpunkt der Analysen alle vollständig vorliegenden *E.coli* Ganzgenomsequenzen repräsentierten (Stand 06.07.2017). Die jeweiligen ermittelten Referenzsequenzen sind in **Abschnitt 3.2.1.3** aufgeführt.

Für die Sequenzrekonstruktion wurde mit dem *Mappingframework batchMap* durchgeführt, welches folgende Schritte umfasste: Die Rohdaten wurden an die Pipeline übergeben und mittels *Trimmomatic* (v.0.32; default parameters) getrimmt (164), die getrimmten *Reads* mittels *BWA sw* (v.0.7.15-r1140; default parameters) (für die Isolate der STs ST3778, ST1196, ST429, ST131, ST117) oder *BWA mem* (v.0.7.10-r789; default parameters) (Isolate von ST1463), auf die ausgewählte Referenz aligniert (150). Das *Pileup* wurde mit *samtools mpileup* und das *variant calling* mit *VarScan* (v.2.3: parameter: min-coverage 10; min-reads2 6; min-avgqual 20; min-var-freq 0.8; min-var-for-hom 0.75; p-value 0.01; strand-filter 0) durchgeführt (165). Die Consensus-Sequenz wurde mit *batchMap* erstellt (176).

Die auf referenzlängen-limitierten generierten Consensus-Sequenzen (*refLength Consensi*) wurden anschließend auf variante Positionen mit Hilfe des Tools *SNPfilter* ohne Exklusionsdistanz reduziert, Positionen mit uneindeutigen *Basecalls* und Lücken wurden ausgeschlossen (161).

### 2.2.4.4 Berechnung und Visualisierung phylogenetischer Bäume

Die gefilterten SNPs wurden zur Berechnung der phylogenetischen Distanz eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden basierend auf den SNP Alignments Maximum-Likelihood Bäume mit *RAXML* (v.8.2.7) mit einem GTR GAMMA Nukleotidmodel (*rapid hill-climbing, 100 starting trees*) erstellt (160).

Die Visualisierung und Annotation der phylogenetischen Bäume wurde mittels der Plattform *iTOL* (v.4.0.3, Interactive Tree Of Life) durchgeführt (153).

### 2.2.4.5 Genotypisierung anhand von Ganzgenomdaten

Zur Identifikation und Charakterisierung von Isolateigenschaften wurden die Webapplikationen vom Center for Genetic Epidemiology (CGE) mit Standardeinstellungen (<http://www.genomicepidemiology.org/>) herangezogen, sowie die Software *SeqSphere+* (v.4.0.1, Ridom) verwendet. Als Input-Dateien dienten *de novo* assemblierten *Reads* (Contigs).

#### 2.2.4.5.1 ResFinder 3.0

Die Identifizierung von Resistenzgenen aus den Ganzgenomdaten wurde mit Hilfe der Webapplikation *ResFinder 3.0* durchgeführt (162). Hierbei wurden alle Gensequenzen aus der *ResFinder 3.0* Datenbank gegen die bereitgestellten assemblierten *Reads* (Contigs) geblastet.

#### 2.2.4.5.2 MLST 1.8

Neben der PCR-basierten MLST nach Wirth *et al.* kann der Sequenztyp auch aus den Ganzgenomdaten eines Isolats extrahiert werden (77). Zu diesem Zweck wurde das Onlinetool *MLST 1.8* von Larsen *et al.*, sowie die Software *SeqSphere+* (v.4.0.1, Ridom) verwendet (155). Beide Programme gleichen die MLST Allelvarianten direkt mit der aktuellen *E. coli* MLST Datenbank (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) ab und geben die entsprechenden Sequenztypen aus.

#### 2.2.4.5.3 PlasmidFinder 1.3 und pMLST 1.4

Die Identifizierung von Replikonsequenzen wurde mit Hilfe des Onlinetools *PlasmidFinder 1.3* durchgeführt (157). Hierbei wurden *de novo* assemblierte Contigs mit einer Datenbank, welche die entsprechenden Replikonsequenz-Marker enthält, abgeglichen. Die Ergebnisse von *PlasmidFinder 1.3* lassen nur eine Aussage über die An- oder Abwesenheit einer Replikonsequenz zu, nicht jedoch über die Anzahl und Größe der Plasmide.

Lagen in den Ganzgenomdaten Replikonsequenzen mit einem existierenden pMLST Schema vor, so wurden diese durch das Onlinetool *pMLST 1.4* typisiert (157). Mit Hilfe der Plasmid Multilokus Sequenztypisierung (pMLST) können Plasmide, analog zur MLST, in verschiedene Sequenztypen unterteilt werden. Ein pMLST Schema ist Replikontyp-spezifisch. Das für diese Arbeit relevante pMLST Schema war für den Replikontyp IncI1 und basiert auf fünf Loci.

#### 2.2.4.5.4 VirulenzFinder 1.5

Analog zum *ResFinder 3.0* können mit dem *VirulenzFinder 1.5* Virulenzfaktoren auf Ebene der DNA identifiziert werden (166). Das Tool wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Shigatoxin Gene *stx1* und *stx2* zu identifizieren.

#### 2.2.4.5.5 ST131 Typisierung anhand von *fimH*, *gyrA* und *parC*

Die Populationsstruktur von *E. coli* ST131 kann, basierend auf einer Kombination aus spezifischen Markerallelen, differenziert werden. Zur Einteilung in die Klade A, B und C und ihrer jeweiligen Subklade wurden das Typ 1 Fimbrien-Adhäsion Allel *fimH*, das DNA Gyrase Untereinheit A Allel *gyrA*, das DNA Topoisomerase 4 Untereinheit A Allel *parC* und das ESBL Gen Allel *bla<sub>CTX-M</sub>* herangezogen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von *SeqSphere+* (v.4.0.1, Ridom) gegen die jeweiligen Alleldatenbanken

abgeglichen (*blastn* Algorithmus). Die Allelsequenzen für *fimH* und *bla*<sub>CTX-M</sub> entstammten den Datenbanken von *ResFinder 3.0* und *FimTyper 1.0* des Center for Genomic Epidemiology (162, 177). Für das *parC* Allel wurde die Sequenz mit dem Locustag ECs3903 und für das *gyrA* Allel die Nukleotidsequenz mit dem Locustag ECs3114 aus dem Genom von *E. coli* K12 MG1655 (GenBank Accession No. NC\_000913.3) extrahiert. Die Allelklassifizierung von *gyrA* und *parC* Allele erfolgte nach Johnson *et. al* (104, 178). Um die *bla*<sub>CMY-2</sub> Studienisolate in den *E. coli*-ST131 Gesamtkontext zu stellen wurden zusätzliche 1371 *E. coli*-ST131 Genomsequenzen von der Plattform EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) aus dem Zeitraum 2000 - 2017, heruntergeladen (Stand Januar 2018) und analysiert. Auf Basis der Genomsequenzen wurden die verschiedenen Isolate mittels des beschriebenen cgMLST Schemas (**Abschnitt 2.2.4.6**) und zusätzlich der Allele *fimH*, *gyrA*, *parC* und *bla*<sub>CTX-M</sub> typisiert. Außerdem wurden die Genomdaten hinsichtlich verschiedener Allelvarianten von *bla*<sub>CMY</sub> und *replIncl1* und *replInck2* untersucht.

#### 2.2.4.6 cgMLST (SeqSphere+)

Die höherauflösende Typisierung der *E. coli* Isolate der CMY-2 Studie wurde anhand einer cgMLST durchgeführt. Aus Mangel eines etablierten *E. coli* cgMLST Schemas wurde in dieser Studie ein *ad hoc* cgMLST Schema erstellt. Die Erstellung des cgMLST Schemas und die nachfolgenden Analysen wurden mit der Software *SeqSphere+* (v.4.0.1, Ridom GmbH) durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst eine Referenzsequenz, *E. coli* O157:H7 str. Sakai (GenBank Accession No. NC\_002695.1), ausgewählt. Die Gene dieses Genoms bilden die Grundlage aller zu analysierender Gene, welche im späteren cgMLST Schema enthalten sein werden. Da in einer cgMLST nur Gene analysiert werden die im Idealfall in allen Organismen der zu untersuchenden Spezies auftreten, werden zusätzliche sogenannte *Query Genomes* benötigt. Mit Hilfe dieser *Query Genomes* wird mit Hilfe des in *SeqSphere+* integrierten Tools *cgMLST TargetDefiner* (v.1.4) die Schnittmenge der gemeinsam vorkommenden Gene des Organismus definiert. Zu diesem Zweck werden die Gene der *Query Genomes* gegen die Gene des Referenzgenoms aligniert. In der vorliegenden Studie wurden zum Zeitpunkt der Erstellung des Schemas alle 43 ringgeschlossenen vorliegenden *E. coli* Genome von der NCBI RefSeq und INSDC GenBank Datenbank als *Query Genomes* eingesetzt (**Tabelle A-3**).

Mit Hilfe des *cgMLST TargetDefiner* (v.1.4) werden die ORFs des Referenzgenoms extrahiert und in 3 Gruppen kategorisiert: *cgMLST*, *Accessory* und *Discarded*. Die Gruppe *cgMLST* enthält alle ORFs größer 50 bp, welche zudem nicht homolog zu weiteren ORFs sind (mehr als 100 bp Überlappung bei mehr als 90 % Sequenzidentität), mehr als ein Stop-Kodon oder ein vorzeitiges Stop-Kodon enthalten, nicht mit anderen ORFs überlappen und in allen *Query Genomes* identifiziert wurden (Alignment von 100 % bei einer Sequenzidentität von mindestens 90 %). Die ORFs dieser Gruppe wurden als Kerngenomgene



definiert. Im erstellten *E. coli ad hoc* cgMLST Schema fallen 2 547 ORFs unter diese Kategorie. Die ermittelte Kerngenomgröße liegt in der Größenordnung, welche zuvor in Studien von Rasko *et al.* und Tenaillon *et al.* ermittelt wurden (71, 90). Die Gene der Gruppe *Accessory* enthält alle ORFs größer 50 bp, welche zudem nicht homolog zu weiteren ORFs sind (mehr als 100 bp Überlappung bei mehr als 90 % Sequenzidentität), mehr als ein Stop-Kodon oder ein vorzeitiges Stop-Kodon enthalten, nicht mit anderen ORFs überlappen, aber nicht in allen *Query Genomes* auftraten. ORFs dieser Gruppe können bedarfsweise bei späteren Analysen mit einbezogen werden, gehören aber nicht dem Kerngenom an. Im erstellten *E. coli ad hoc* cgMLST Schema fallen 2 103 ORFs unter diese Kategorie. Die dritte Gruppe, *Discarded*, enthält alle ORFs, welche homolog (mehr als 100 bp Überlappung bei mehr als 90 % Sequenzidentität) zu anderen ORFs sind oder Stop-Kodons enthalten. Diese ORFs werden in weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Im erstellten *E. coli ad hoc* cgMLST Schema fallen 552 Gene unter diese Kategorie.

Die zu untersuchenden Sequenzen wurden im Anschluss mit Hilfe des cgMLST Schemas analysiert. Hierfür wurde ein Treshold von 100 % für das Alingment bei einer Sequenzidentität von mindestens 70 % für die jeweilige Kerngenomgensequenz angelegt. Abweichungen in der Sequenzidentität zur definierten Kerngenomgensequenz führten zur Zuweisung einer neuen Allelvariante des jeweiligen Gens.

Die erhaltenen Distanzen der cgMLST Allelvarianten wurden zur Visualisierung der phylogenetischen Distanzen herangezogen und entweder als Neighbour-Joining Tree (Parameter: `pairwise ignoring missing values; % columns difference`) oder Minimum Spanning Tree (Parameter: `pairwise ignoring missing values; % columns difference`) visualisiert.

#### 2.2.4.7 Plasmidrekonstruktion CMY-2 Studie

Die durch die Tools *PlasmidFinder 1.3* und *pMLST 1.4* ermittelten Plasmidreplikontypen und pST lassen keinen Rückschluss auf das *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Replikon zu, daher wurden die Sequenzen der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden Plasmide im Detail aufgeschlüsselt. Die Rekonstruktion der Plasmidsequenzen erfolgte anhand des in **Abbildung 10** dargestellten Arbeitsschemas und, sofern nicht anders erwähnt, mit Hilfe des Programms *Geneious* (v.10.0.5, Biomatters Ltd.). Die *A5-miseq* assemblierte Contigs eines Isolats stellten den *Input* bei der Plasmidrekonstruktion dar. Zunächst wurden nur *bla*<sub>CMY-2</sub>-enthaltende Contigs durch ein Alignment auf die Gensequenz von *bla*<sub>CMY-2</sub> (GenBank Accession No.: X91840.1) herausgefiltert (Geneious Mapper, `medium-low sensitivity, no iterations`). Mögliche Plasmidreplikonsequenzen auf diesen Contigs wurden durch eine *blastn* Analyse gegen die *PlasmidFinder 1.3* Datenbank ([https://bitbucket.org/genomicpidemiology/plasmidfinder\\_db](https://bitbucket.org/genomicpidemiology/plasmidfinder_db)) identifiziert. Anschließend wurden die Contigs unter Verwendung von *blastn* mit auf der NCBI GenBank

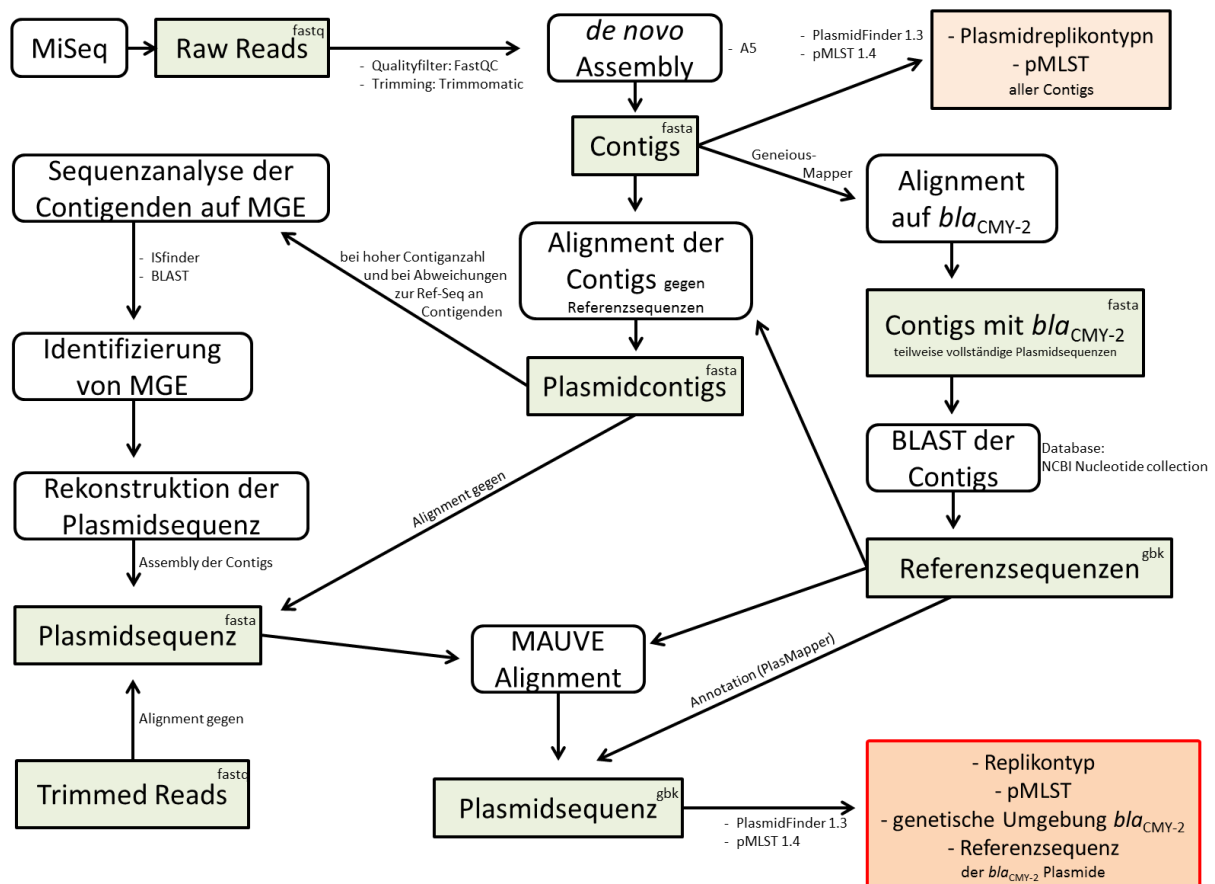
*Nucleotide Collection (nr/nt)* Datenbank hinterlegten Nukleotidsequenzen auf <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> auf ähnliche/identische Nukleotidsequenzen untersucht. Anhand der BLAST Ergebnisse wurden Nukleotidsequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu den ermittelten Contigs als mögliche Referenzplasmide ausgewählt. Ermittelte Referenzsequenzen sind in **Tabelle 13** aufgeführt.

**Tabelle 13: Referenzsequenzen für *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Plasmide und chromosomalen Hintergrund**

Genetischer Hintergrund	Referenzplasmid	Größe [bp]	GenBank Accession No.
IncK2	pDV45	85.963	KR905384.1
	pTMSA1088	79.297	KR905386.1
Incl1	pC-6, ( <i>partial sequence</i> )	90.486	KT186369.1
	pCVM29188_101	101.461	NC_011077.1
	P12-4374_96	96.042	CP012929.1
IncA/C	pSAN1-1736	160.227	CP014658.1
Chromosomal	TN44889	12.515	FM246884.1

Im nächsten Schritt wurden die Contigs eines jeweiligen Isolats gegen die ermittelte Referenzsequenz und gegen Referenzsequenzen des identischen Replikontyps aligniert (*Geneious Mapper*, *Medium-low sensitivity*, *no iterations*). Für den Fall, dass es beim Alignment zu Nichtübereinstimmungen der Sequenzen kam, wurden die Ursachen dieser Missalignments detaillierter untersucht. In der Regel waren Missalignments durch Insertionen oder durch invertierte und neuorganisierte Nukleotidsequenzabschnitte bedingt. Inversionen und Reorganisation von Sequenzabschnitten traten vor allem im Bereich der Shufflon-Regionen der Plasmide auf. Zusätzliche Sequenzabschnitte waren meist durch die Insertion mobiler genetischer Elemente (MGEs) bedingt. Diese führten während der *de novo* Assemblierung häufig zu Assemblierungsstops und daher zu Fragmentierung in einzelne Contigs. Folglich wurden die abweichenden Sequenzabschnitte durch das Tool *ISfinder* (152) und durch eine *blastn* Analyse gegen die NCBI GenBank *Nucleotide Collection (nr/nt)* Datenbank auf MGEs untersucht. Identifizierte MGEs wurden entsprechend annotiert und an den jeweiligen Contigenden konkateniert. Um fälschliche Insertionen auszuschließen wurde auf die erweiterte Plasmidsequenz, bestehend aus den entsprechenden Contigs, deren Reihenfolge und Orientierung nach der jeweiligen Referenzplasmidsequenz angeordnet waren, und den soweit möglich manuell aufgefüllten Lücken (MGE bedingte Assemblierungsabbrüche), die getrimmten *Reads* aligniert (*Geneious Mapper*, *Medium-low sensitivity*). Abschließend wurde die finale Plasmidsequenz und das Referenzplasmid durch *MAUVE* (v.2.3.1, *progressiveMauve algorithm*, *default parameters*) aligniert, um die Sequenzorientierung der Plasmide identischer Replikontypen untereinander zu überprüfen. Die Plasmidsequenz wurde durch *Geneious* integriertes Annotationstool (*PlasMapper features*, *Similarity: 95 %*) annotiert; für die Annotationsdatenbank wurden die annotierten Gene der Referenzplasmide herangezogen. Die

gesuchten genetischen Marker (Replikontyp, pMLST falls vorhanden, genetische Umgebung von *bla<sub>CMY-2</sub>*) konnten nun anhand der rekonstruierten Plasmidsequenz bestimmt werden.



**Abbildung 10: Ablaufschema für die Identifizierung von *bla<sub>CMY-2</sub>* Plasmiden.** Prozessschritte sind weiß und Fileformate in grün und der Output in orange hinterlegt.

### 2.2.4.8 Inck Plasmidvergleiche

Um einen Mapping-freien Vergleich der Inck2 Plasmide durchführen zu können wurde für Plasmide, welche eine Inck2 Plasmidreplikonsequenz hatten, eine Kerngenomanalyse und ein Vergleich der vorhandenen Gene durchgeführt. Die ORFs des Plasmids pTMSA1088 wurden mit Hilfe des SeqSphere *cgMLST Target Definer* (v.1.4) vorhergesagt und extrahiert (**Tabelle A-4**). Es wurden 89 ORFs identifiziert. Im Anschluss wurden die Sequenzen aller rekonstruierter Plasmide dieser Studie mit einer Inck2 Plasmidreplikonsequenz auf die Anwesenheit und Identität dieser ORFs analysiert. 67 von 89 ORFs kamen in allen Plasmiden vor. Jede Variante eines ORFs wurde zudem als eine Allelvariante definiert. Analog zur cgMLST konnte nun die phylogenetische Distanz der Plasmide mit Hilfe eines Minimum Spanning Trees (basierend auf 67 Genen, pairwise ignoring missing values) visualisiert werden.

Neben den 68 Plasmidsequenzen der Studienisolate wurden 18 weitere Plasmidsequenzen von den NCBI Datenbanken GenBank und SRA (aus Dänemark (GenBank Accession No. ERX994365, ERX994356, ERX994362, ERX994357, ERX994360, ERX994361, ERX994363, ERX994364, ERX994355), den Niederlanden (GenBank Accession No. JXMX01000007), der Schweiz (GenBank Accession No. KR905384, KR905385, KR905386, KR905387, KR905388, KR905389, KR905390) und Norwegen (GenBank Accession No. KU312044) bezogen und mit analysiert.

#### 2.2.4.9 Sequenzrekonstruktion der Referenzsequenzen 102/04 K1 und K2 (Fitness-Studie)

Mittels der Assemblierung der PacBio Sequenzdaten wurden die Chromosom- und Plasmidreplikons der Isolate 102/04 K1 und K2 in je ein einzelnes Contig aufgelöst. Ein Ringschluss dieser Contigs wurde durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden überlappende Contigsequenzen im *Self-Dotplot* identifiziert und die Contigs entsprechend gekürzt.

Da die PacBio Sequenzieretechnologie im Gegensatz zur Illumina-Technologie zu Homopolymer-Sequenzierfehlern tendiert, wurden zur Sequenzrekonstruktion die PacBio Ganzgenomdaten mit den Illumina Sequenzdaten kombiniert. Die Ring-geschlossenen PacBio Chromosom- und Plasmidsequenzen wurden daher mit Illumina Sequenzdaten der entsprechenden Isolate korrigiert (*polishing*). Zu diesem Zweck wurden getrimmte Illumina Rohdaten (siehe **Abschnitt 2.2.4.1**) auf die PacBio Contigs (Chromosom und Plasmid) mit Hilfe des *Geneious Mapper* (Parameters: Medium-Low Sensitivity, no iterations) aligniert und die Consensussequenzen (*Geneious Consensus Tool*; Threshold: Majority) generiert.

Die proteinkodierenden Sequenzabschnitte der Consensussequenzen von Chromosom und Plasmid wurden mittels *RAST* Annotationsserver annotiert (159).

#### 2.2.4.10 Ganzgenomvergleiche (Fitness-Studie)

Die Ganzgenomvergleiche der langzeitkultivierten Isolate wurde mit Hilfe der rekonstruierten Sequenzen von 102/04 K1 und K2 durchgeführt.

Für die Identifikation von Sequenzmodifikationen bei 102/04 K1 G<sub>500</sub> wurden die getrimmten Illumina *Reads* zunächst mittels *SPAdes* (v.3.10.1) assembliert. Die erhaltenden Contigs wurden dann mit Hilfe des *Geneious Mappers* (Parameters: Medium-Low Sensitivity, no iterations) auf das Genom von 102/04 K1 G<sub>0</sub> aligniert. Die Vorgehensweise mit einer dem Mapping vorgeschalteten Assemblierung ermöglichte eine bessere Identifikation von Transpositionen und Insertionen im Genom. Traten Insertionen im Vergleich zu 102/04 K1 G<sub>0</sub> auf, so wurden diese unter Verwendung von *blastn*, mit auf der NCBI GenBank *Nucleotide Collection (nr/nt)* Datenbank hinterlegten Nukleotidsequenzen auf

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> auf ähnliche/identische Nukleotidsequenzen untersucht. Wurden dabei mobile genetische Elemente, wie z.B. Insertionssequenzen (IS), identifiziert, so wurden diese mittels der *ISfinder* Datenbank detaillierter identifiziert und annotiert. Im Anschluss wurde die Genomsequenz von 102/04 K1 G<sub>500</sub> entsprechend der ermittelten Sequenzänderungen manuell modifiziert und die getrimmten *Reads* mit Hilfe des *Geneious Mappers* (Parameters: *Medium-Low Sensitivity, no iterations*) auf das modifizierte Genom aligniert und die Consensussequenz (*Geneious Consensus Tool*; Threshold: *Majority*) für ein ringgeschlossenes Chromosom generiert. Für die Erstellung der Plasmidsequenz von 102/04 K1 G<sub>500</sub> wurde analog verfahren.

Die Rekonstruktion der Chromosomsequenz von RS165 K1 G<sub>0</sub> erfolgte analog zum Vorgehen bei 102/04 K1 G<sub>500</sub>. Für die weiteren Vergleiche der RS165 K1 Genomsequenzen wurde die rekonstruierte RS165 K1 G<sub>0</sub> Genomsequenz als Referenzgenom verwendet. Die Plasmidsequenz von RS165 K1 wurde anhand *de novo* assemblierter *Reads* vollständig rekonstruiert (*A5-miseq*), das entsprechende Contig durch eine BLAST Analyse aller Contigs gegen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> identifiziert und das Contig durch ein *Readalignment* auf Sequenzinsertionen überprüft. Die Annotation der Plasmidsequenz pRS165 K1 erfolgte durch den *RAST* Annotationsserver (159).

Für die eigentlichen Genomvergleiche wurden die Sequenzen der drei 102/04 K1 und K2 Isolate, sowie die Sequenzen der RS165 K1 der verschiedenen Generationen untereinander verglichen. Der Sequenzvergleich erfolgte mittels *MAUVE* (v.2.3.1, *progressiveMauve algorithm, default parameters*) (154).



## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 ESBL *E. coli* Populationsstudie - Untersuchung der Populationsstruktur humaner ESBL-*E. coli* Isolate aus unterschiedlichen Quellen anhand der Sequenztypen

In der ersten Projektphase des RESET-Verbundes (2011-2013) wurden in drei Teilprojekten ESBL-bildende *E. coli* vom Mensch gewonnen und die ESBL Genotypen, sowie die Zuordnung zu den phylogenetischen Gruppen ermittelt: (I) In einer von RKI und dem Limbach Laborverbund initiierten Studie wurden 127 nosokomiale (isoliert 48 - 72h nach Klinikaufnahme) und 105 ambulante (meist ambulante Harnwegsinfektionen) *E. coli* Isolate mit ESBL-Phänotyp aus ganz Deutschland gesammelt. (II) Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie der Charité wurden 84 *E. coli* mit ESBL-Phänotyp gewonnen, die von den Patienten bei einem Aufnahmescreening isoliert wurden (139). (III) In einer vom LGL durchgeführten Screening-Studie von 3 344 gesunden Probanden in Bayern wurden weitere 213 *E. coli* mit ESBL-Phänotyp gewonnen (11). Die Untersuchungen in der ersten Studienphase zeigten, dass die häufigsten vertretenen ESBL-Typen in allen Studien CTX-M-15, CTX-M-1 und CTX-M-14 waren. CTX-M-15 hatte dabei bei nosokomialen und ambulanten Isolaten und in der Allgemeinbevölkerung mit ca. 50 % den höchsten Anteil, gefolgt von CTX-M-1 mit 24 - 31 %. Häufigster ESBL-Typ der Fall-Kontroll-Studie der Charité dagegen war CTX-M-1 mit 45 %, gefolgt von CTX-M-15 mit 29 %. Bei der Verteilung der phylogenetischen Gruppen zeigte sich in der Laborverbund Limbach Studie und der Fall-Kontroll-Studie ein hoher Anteil an B2, wogegen bei den Isolaten der Allgemeinbevölkerungsstudie die phylogenetischen Gruppen A und B1 dominierten.

Eine Auswahl dieser ESBL-bildenden nosokomialen (n=46) und ambulanten *E. coli* (n=31), der Isolate der Fall-Kontroll-Studie (n=37) sowie Besiedlungsisolate (n=38) aus der Allgemeinbevölkerung wurden nun weiter phylogenetisch untersucht. Die Auswahl der Isolate erfolgte in Abstimmung mit den RESET Kooperationspartnern und konzentrierte sich auf Isolate, welche übereinstimmende Merkmale (ESBL-Typ, phylogenetische Gruppe) bei Mensch, Tier und Lebensmittel zeigten. Die phylogenetische Charakterisierung erfolgte nach der Multilokus-Sequenztypisierung, die eine weitaus höhere Auflösung als die phylogenetische Gruppierung bietet und ebenso international vergleichbar ist. Die Ermittlung der Sequenztypen erfolgte durch die PCR-basierte MLST und anhand der Extraktion der MLST-Loci aus Ganzgenomdaten. Zusätzlich wurde durch ein PCR-basiertes Screening aller in den Studien gesammelten Isolate die Prävalenz des Sequenztypes ST131 ermittelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den drei Teilprojekten dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2016 veröffentlicht (105).

### 3.1.1 Studie RKI-Laborverbund Limbach

Die Limbach-Labor-Studie umfasste in der Summe 232 ESBL-bildende *E. coli* (138). Die am häufigsten auftretenden ESBL-Typen waren sowohl bei nosokomialen als auch bei ambulanten Isolaten CTX-M-15 (nosokomial 49,6 %, n=63; ambulant 51,4 %, n=54), CTX-M-1 (nosokomial 30,7 %, n=39; ambulant 25,7 %, n=27) und CTX-M-14 (nosokomial 4,7 %, n=6; ambulant 6,7 %, n=7). Bei mehreren Isolaten konnten ESBL der TEM- und SHV-Typen (TEM-52: n=4, TEM-12: n=2, SHV-12: n=5), sowie seltener auftretende CTX-M (CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-32, CTX-M-104) Varianten identifiziert werden. Eine Carbapenemresistenz wurde nicht beobachtet. Eine Fluorchinolonresistenz wurde bei 71,6 % (nosokomial) und 73,3 % (ambulant) der Isolate nachgewiesen. Die Bestimmung der phylogenetischen Gruppen zeigte, dass die Mehrheit der 232 *E. coli* Isolate der phylogenetischen Gruppe B2 angehörten (nosokomial: 41,7 %, n=53; ambulant 49,5 %, n=52). Der Rest der Isolate verteilte sich auf die übrigen drei phylogenetischen Gruppen (nosokomial: A: 24,4 %, n=31; B1: 12,6 %, n=16; D: 21,2 %, n=27; ambulant: A: 18,1 %, n=19; B1: 14,3 %, n=15, D: 18,1 %, n=19).

Der Sequenztyp wurde von 66 der 105 ESBL-*E. coli*-Isolate aus dem ambulanten Bereich, sowie von 83 der 127 nosokomialen ESBL-*E. coli*-Isolate ermittelt; insgesamt wurden 64,2 % der Studienisolate typisiert. Die spezifische PCR für die klonale Linie *E. coli*-ST131-O25b ergab einen Anteil von 35,8 % (n=83) für *E. coli*-ST131; im Detail 32,3 % (n=41) bei den nosokomialen ESBL-*E. coli* und 40,0 % (n=42) bei den ambulanten *E. coli*. Alle *E. coli*-ST131 aus dem nosokomialen Bereich, sowie der Großteil der *E. coli*-ST131 aus dem ambulanten Bereich (39/42 Isolaten) gehörten der klonalen Linie O25b:H4-ST131 an. Es fiel auf, dass drei Isolate, welche mit Hilfe der Sanger- oder Illumina-Sequenzierung dem Sequenztyp ST131 zugeordnet wurden, in der ST131-spezifischen PCR negativ getestet wurden. Ursächlich hierfür waren die eingesetzten Primer, welche spezifisch für das O25b *rfbO* (O-Lipopolysaccharide) Allel amplifizieren. Da der Sequenztyp ST131 neben dem Serotyp O25b auch den Serotyp O16 umfasst, wurden ST131 positive Isolate von der ST131-spezifischen PCR (Blanco *et al.* 2009) nicht erfasst. Daher wurden Isolate der phylogenetischen Gruppe B2, welche in der ST131-spezifischen PCR ein negatives Testergebnis aufwiesen zusätzlich mit O16-spezifischen Primern von Johnson *et al.* überprüft (146). Mittels des erweiterten Typisierschemas von Johnson *et al.* und einer zusätzlichen durchgeführten Serotypie (Mikroagglutination Assay mit spezifischen Kaninchen-Antiseren (Sifin Diagnostics GmbH) durchgeführt von Fr. Angelika Fruth, FG11, RKI) wurden von den verbleibenden drei Isolaten ein Isolat als O16:H5b, sowie ein weiteres O102:H- typisiert. Ein Stamm konnte nicht typisiert werden.

Die MLST Analyse bestätigte 8 *E. coli*-ST131 Isolate sowie 39 weitere Sequenztypen, darunter die drei neuen Sequenztypen ST5128, ST5219, ST5130 (eingereicht bei <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>). Insgesamt zeigte die MLST-Analyse eine hohe Diversität an klonalen Linien. Abgesehen vom hohen ST131-Anteil wurden mehrfach die Sequenztypen ST410 (n=12) und ST10 (n=7) identifiziert. Weitere



Sequenztypen ST101, ST141, ST361, ST48, ST617, ST648 und ST88 waren je zwei oder dreimal vertreten (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Identifizierte Sequenztypen von ESBL-E. coli aus unterschiedlichen Studien.**

MLST nosokomialer Isolate		MLST ambulanter Isolate		MLST von Besiedlungsisolaten (Fall-Kontroll-Studie)		MLST von Besiedlungsisolaten	
Pietsch <i>et al.</i> , 2017		Pietsch <i>et al.</i> , 2017		Leistner <i>et al.</i> , 2013		Valenza <i>et al.</i> , 2014	
Sequenztyp	n (ST131 [%])	Sequenztyp	n (ST131 [%])	Sequenztyp	n (ST131 [%])	Sequenztyp	n (ST131 [%])
ST131	41 (32.3%) <sup>a</sup>	ST131	42 (40.0%) <sup>a c</sup>	ST131	22 (26.0%) <sup>a c</sup>	ST131	26 (12.3%) <sup>a c</sup>
ST410	8	ST410	4	ST410	2	ST410	3
ST10	5	ST10	2	ST10	1	ST10	4
ST617	3	ST405	2	ST38	2	ST38	12
ST361	3	ST648	2	ST372	2	ST117	3
ST101	2	ST1170	1	ST617	2	ST69	7
ST141	2	ST5130	1	ST363	2	ST58	1
ST48	2	ST453	1	ST405	2	ST405	1
ST111	1	ST141	1	ST73	1	ST2178	1
ST88	1	ST1284	1	ST48	1	ST4060	1
ST69	1	ST1431	1	ST2079	1	ST227	1
ST1126	1	ST428	1	ST23	1	ST5017	1
ST1266	1	ST545	1	ST624	1	ST2624	1
ST5128	1	ST5129	1	ST361	1	ST650	1
ST219	1	ST12	1	ST93	1	ST34	1
ST540	1	ST1397	1	ST1266	1	ST1114	1
ST354	1	ST3171	1	ST46	1	ST744	1
ST68	1	ST155	1	ST1303	1	ST394	1
ST95	1	ST2003	1	ST1727	1	n.t. <sup>b</sup>	144
ST73	1	n.t. <sup>b</sup>	39	ST69	1		
ST1011	1			ST393	1		
ST93	1			ST88	1		
ST106	1			ST1011	1		
ST443	1			ST1464	1		
ST393	1			ST453	1		
n.t. <sup>b</sup>	44			n.t. <sup>b</sup>	31		
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>105</b>		<b>83</b>		<b>211</b>	

Der Anteil von ST131 an allen Isolaten einer jeweiligen Studien ist angegeben; <sup>a</sup> Die Typisierung von ST131 erfolgt bei allen Isolaten mittels PCR (Blanco *et al.*, 2009); <sup>b</sup> n.t. = nicht typisiert; <sup>c</sup> MLST (Wirth *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2012) erfolgte für ausgewählte Isolate; <sup>c</sup> neben ST131-O25b:H4 sind weitere Serotypen enthalten (PCR ST131-O16 nach Johnson *et al.*, 2014) und Serotypie für ausgewählte Isolate)

### 3.1.2 Fall-Kontroll-Studie (Charité)

Von den 84 gewonnen Isolaten der Fall-Kontroll-Studie war CTX-M-1 mit 45 % (n=37) der häufigste ESBL-Typ, gefolgt von CTX-M-15 (29 %, n=24) und CTX-M-14 (13 %, n=11). Eine Carbapenemresistenz wurde bei den Studienisolaten nicht beobachtet. Eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Nalidixinsäure konnte bei 49% (n=41) bzw. 68% (n=57) der Isolate nachgewiesen werden. Die Isolate wurden den phylogenetischen Gruppen B2 (40 %, n=34), B1 (25 %, n=21), D (19 %, n=16) und A (17 %, n=14) zugeordnet. Im Gegensatz zu den CTX-M-1-positiven Stämmen, die den vier

phylogenetischen Gruppen in nahezu gleichen Anteilen zugeordnet waren (21 – 30 %), gehörten 67 % der CTX-M-15-positiven *E. coli* der phylogenetischen Gruppe B2 an.

Es wurden 52 der 84 ESBL-*E. coli*-Isolate sequenztypisiert und dabei 25 verschiedene Sequenztypen identifiziert. Der ST131-Anteil war bei der Fall-Kontroll-Studie mit 26 % (n=22) geringer als bei den nosokomialen/ambulanten Isolaten des Limbach-Laborverbundes (32,3 %/40 %). Zudem wurden vier Isolate O25b falsch-negativ getestet. Mittels der O16-spezifischen PCR von Johnson *et al.* konnten drei dem Serotyp O16 und damit ST131 zugeordnet werden. Das verbleibende Isolat erwies sich in der Serotypie als *Orough*:H4. Neben ST131 wurden auch die bei den ambulanten/nosokomialen Isolaten des Limbach Laborverbundes mehrfach vorkommenden Sequenztypen ST410 (n=2) und ST10 (n=1) identifiziert (**Tabelle 14**).

### 3.1.3 Besiedlungsstudie Allgemeinbevölkerung

Von den 211 ESBL-*E. coli*-Isolaten von gesunden Probanden in Bayern wurde beim größten Teil der Isolate der ESBL-Typ CTX-M-15 identifiziert (46 %, n=97), gefolgt von CTX-M-1 (24,2 %, n=51) und CTX-M-14 (14,7 %, n=31). Bei drei der 211 ESBL-positiven Isolate wurde eine Resistenz gegenüber Ertapenem identifiziert (1,4 %). Weiterhin waren 51,6 % (n=109) und 36,0 % (n=76) gegenüber Nalidixinsäure bzw. Ciprofloxacin resistent. Die phylogenetische Typisierung zeigte, dass der Großteil der Isolate der phylogenetischen Gruppe A (40,3 %, n=85) und D (38,4 %, n=81) angehörte. Die phylogenetischen Gruppen B2 und B1 waren mit einem Anteil von 15 % (n=31), bzw. 6,6 % (n=14) vertreten.

Der Sequenztyp wurde für 67 Isolate bestimmt (**Tabelle 14**). Unter diesen wurden 18 verschiedene Sequenztypen identifiziert. Die PCR ergab eine ST131 Rate von 12,3% (n=26). Des Weiteren traten die Sequenztypen ST38 (n=12), ST69 (n=7), ST10 (n=4), ST410 (n=3) und ST117 (n=3) in höherer Anzahl auf (**Tabelle 14**). Ein ST131 Isolat gehörte dem Serotyp O16 an und wurde mittels der O16-spezifischen PCR ermittelt.

### 3.1.4 Analyse der ST131 Isolate

Im Rahmen der ESBL-*E. coli* Populationsstudie wurde der Großteil der ST131-*E. coli* mittels der *rfbO25b*-spezifischen PCR nach Blanco *et al.* ermittelt (140). Aufgrund der Auswahlkriterien für die Ganzgenomsequenzierung und PCR-basierte MLST wurden 19 dieser *rfbO*-typisierten Isolate zusätzlich mit Hilfe der MLST nach Wirth *et al.* bestimmt (77). Dabei fiel eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der MLST und der *rfbO* Typisierung auf: Acht ST131-*E. coli* Isolate wurden anhand der *rfbO*-PCR falsch-negativ typisiert. In einer nachträglichen Serotypisierung waren diese Isolate negativ für den Serotyp O25b und konnten daher nicht durch die *rfbO25b* PCR erfasst werden. Stattdessen wurden die Isolate dem Serotyp O16 oder *Orough* zugeordnet. Eine anschließende *rfbO16*-spezifische PCR von Johnson *et*

al. bestätigte den Serotyp O16. Von vier falsch-negativen ST131 Isolaten lagen Ganzgenomdaten vor. Der aus den Ganzgenomdaten abgeleitete Serotyp dieser Isolate war ebenfalls O16.

Insgesamt wurden zwölf ST131 Isolate Ganzgenom-sequenziert. Nur zwei dieser Isolate hatten den ESBL-Typ CTX-M-15, während die verbleibenden Isolate die ESBL-Varianten CTX-M-1, CTX-M-14 und CTX-M27 trugen. Anhand der Ganzgenomdaten konnten die Isolate den spezifischen ST131 Kladen zugeordnet werden (**Tabelle 15**).

**Tabelle 15: Zuordnung der ESBL-ST131-Isolate zu den jeweiligen ST131-Kladen**

Isolat	ESBL-Typ	Serotyp	<i>fimH</i> Allel	ST131 Klade
RS099	CTX-M-15	O25	<i>fimH30</i>	C2/H30Rx
RS204	CTX-M-15	O25	<i>fimH30</i>	C2/H30Rx
RS022	CTX-M-1	O25	<i>fimH30</i>	C1-nM27/H30R
RS017	CTX-M-14	O25	<i>fimH30</i>	C1-nM27/H30R
RS100	CTX-M-14	O25	<i>fimH30</i>	C1-nM27/H30R
RS123	CTX-M-14	O25	<i>fimH30</i>	C1-nM27/H30R
RS045	CTX-M-27	O25	<i>fimH30</i>	C1-M27/H30R
RS060	CTX-M-27	O25	<i>fimH30</i>	C1-M27/H30R
RS139	CTX-M-14	O16	<i>fimH41</i>	A/H41
RS264	CTX-M-1	O16	<i>fimH41</i>	A/H41
RS263	CTX-M-1	O16	<i>fimH41</i>	A/H41
RS295	CTX-M-14	O16	<i>fimH41</i>	A/H41

### 3.1.5 Nachweis weiterer Resistenzgene

Aufgrund der Entdeckung der Plasmid-vermittelten Colistinresistenzgens *mcr-1* im Jahr 2015 wurden alle ESBL-Studienisolate auf *mcr-1* überprüft (147). Ein Nachweis von *mcr-1* konnte in dieser Studiensammlung nicht erbracht werden.

### 3.2 CMY-2 Studie - Vergleich von *E. coli* Isolaten mit AmpC (CMY-2)-Bildung von Mensch, Tier und Tierprodukt

#### 3.2.1.1 Isolatauswahl und Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit

In Zusammenarbeit mit mehreren Projektpartnern (FU, FLI, BfR) aus dem RESET Projekt wurden 164 *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende *E. coli* Isolate von Lebensmittelproben (Tierprodukten n=63), verschiedenen Nutztieren (gesund n=50, erkrankt n=5) und Patienten aus Klinik/Ambulanz (n=46) ausgewählt. Der Großteil der Isolate wurde im Zeitraum 2011 – 2016 im Rahmen verschiedener Studien des RESET-Projektes zusammengetragen; da die Zahl der Isolate, die in diesem Zeitraum vom Menschen gewonnen wurden, zu gering war, wurde der Zeitraum auf 2008 - 2016 erweitert, wodurch weitere klinische Isolate aus der Stammsammlung des RKI eingeschlossen werden konnten. Um einheitliche und vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Beprobung (veterinärmedizinische Studien) und Basistypisierung dabei jeweils beim bearbeitenden Partner durch harmonisierte Arbeitsprotokolle durchgeführt.

Alle 164 CMY-2-produzierenden *E. coli* Isolate dieser Studie wiesen Resistenz gegen Ampicillin, Cefotaxim, Ceftazidim und Cefoxitin auf. Bis auf eine Ausnahme (Isolat 10-16) wurde keine Resistenz gegenüber Imipenem und Meropenem nachgewiesen. Zusätzlich wurde bei 20 von 46 Isolaten humanen Ursprunges (43,5 %) eine Ciprofloxacinresistenz beobachtet. Die Ciprofloxacinresistenzrate bei Isolaten von Tier- oder Lebensmittelproduktproben lag bei 17,8 % (21 von 118 Isolaten). Da das Screening der Ganzgenomsequenzen für zwölf Isolate das Vorhandensein eines plasmidlokalisierten Colistinresistenzgens *mcr-1* zeigte (siehe Abschnitt Resistenzgennachweis), wurde die Colistinresistenz dieser Isolate nachträglich mittels Mikrobouillon-Verdünnungstest (Kriterien nach EUCAST v.7.1) bestätigt: Für alle zwölf Isolate wurden MHK-Werte für Colistin von 4 - 8mg/L gemessen.

#### 3.2.1.2 Resistenzgennachweis

Die Ganzgenomdaten wurden mittels des Tools ResFinder 1.4 auf bekannte Antibiotikaresistenzgene untersucht. Wie erwartet wurde bei allen Isolaten das AmpC-Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> nachgewiesen. Zusätzlich wurden bei ca. der Hälfte der Isolate weitere  $\beta$ -Laktamasegene beobachtet. Am häufigsten nachgewiesen wurde *bla*<sub>TEM</sub> (n=72). Außerdem wurden *bla*<sub>CTX-M-Gruppe1/9</sub> (n=8), *bla*<sub>OXA-1-like</sub> (n=5), *bla*<sub>SHV-like</sub> (n=5) und *bla*<sub>OXA-10-like</sub> (n=1) identifiziert. In mehreren Isolaten wurden Plasmid-vermittelte Fluorchinolonresistenzgene, sog. *plasmid mediated quinolone resistance* (PQMR) *genes*, identifiziert: *aac(6')-Ib-cr* (n=7), *qnrS1* (n=4), *qnrB1* (n=1), und *qnrB19* (n=1). Außerdem waren zwölf Isolate Träger des plasmidlokalisierten Colistinresistenzgens *mcr-1*. Für das einzelne Carbapenem-resistente Isolat (10-16) ergab die Analyse kein Vorhandensein von Carbapenemasegenen. Die genaue Auflistung der Resistenzgene jedes Isolates ist in **Tabelle A-2** ersichtlich.

### 3.2.1.3 Populationsuntersuchungen

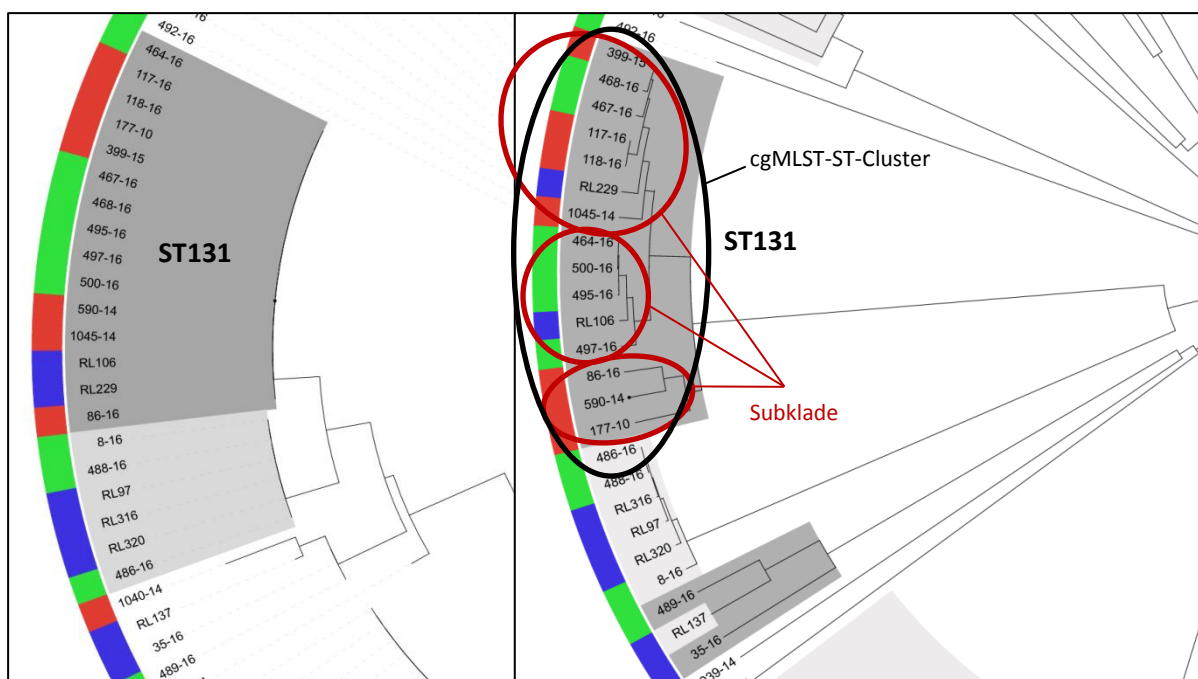
Ein erster Einblick in die Populationsstruktur der *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden *E. coli* wurde durch die Einteilung der Isolate in ihre phylogenetischen Gruppen erzielt. Die 164 Isolate teilten sich entsprechend der Typisierung nach Clermont *et al.* in die vier phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D auf (72). Am häufigsten vertreten waren Isolate der Phylogenetischen Gruppe D (n=74), gefolgt von A (n=35), B1 (n=31) und B2 (n=24).

Eine detailliertere Auflösung der Populationsstruktur wurde im Anschluss durch die Bestimmung der Sequenztypen (STs) erreicht. Die assemblierten Genomdaten der Isolate wurden dafür mittels des Tools *MLST 1.8* auf der CGE Plattform (<http://www.genomicepidemiology.org/>) nach dem MLST Schema von Wirth *et al.* typisiert (77, 155). Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sequenztyp-Diversität (**Tabelle 16**). Bei Isolaten von Mensch (n=46), Nutztier (n=63) und Lebensmittel (n=55) wurden je 31, 29 und 20 verschiedenen STs identifiziert. Die am häufigsten vertretenen Sequenztypen unter allen Isolaten waren ST38 (n=19), ST131 (n=14) und ST117 (n=13). Bei humanen Isolaten zeigte ST131 mit 13 % (n=6) die höchste Prävalenz. Bei Isolaten von Nutztieren und Lebensmitteln wurde dieser ST in 12,2 % und 3,8 % der Isolate ermittelt. Am häufigsten vertretener Sequenztyp bei Isolaten von Nutztier- und Lebensmittelproben war dagegen ST38 (Hühnerfleisch n=9; Huhn n=6; Rind n=1). Des Weiteren wurden identische Sequenztypen in allen drei Bereichen (Mensch/Tier/Tierprodukt) nachgewiesen: ST38 (Mensch n=3; Hühnerfleisch n=9; Huhn n=6; Rind n=1), ST131 (Mensch n=6; Hühnerfleisch n=2; Huhn n=5; Pute n=1) und ST117 (Mensch n=4; Hühnerfleisch n=1; Putenfleisch n=1; Schweinefleisch n=1; Huhn n=1; Schwein n=1). Einige weitere ST wurden exklusiv bei Isolaten von Nutztier und Fleischprodukt beobachtet: ST429 wurde beispielsweise nur in Huhn (n=3) bzw. Hühnerfleisch (n=3) nachgewiesen.

Obwohl mit Hilfe der MLST ein detaillierterer Einblick in die Populationsstruktur von *E. coli*, als mit der Einteilung in phylogenetische Gruppen möglich ist, gibt sie doch nur ein grobes Abbild der Verwandtschaftsbeziehungen der *E. coli* Population wieder. Es lassen sich auf der Basis von Sequenztypen, die klonale Linien repräsentieren, keine Aussagen über direkte Verwandtschaftsverhältnisse von Isolaten oder mögliche Transmissionereignisse treffen. Die vorliegenden Ganzgenomdaten wurden daher mittels eines cgMLST Schemas hochauflösender typisiert. Der Vorteil der cgMLST gegenüber der klassischen MLST ist das höhere Auflösungsvermögen, da ein viel größerer Teil des Genoms bei der vergleichenden Analyse berücksichtigt wird. Die cgMLST zeigte ein differenzierteres Bild der Isolate jedes

Tabelle 16: Übersicht über die Sequenztypen und ST131 Raten von *E. coli* Isolaten mit CMV-2-Bildung isoliert von Mensch, Tier und Tierprodukt

Isolate vom Mensch			Isolate vom Tierprodukt				Isolate von Nutztieren								
		Huhn	Pute		Schwein		Huhn		Pute		Schwein		Rind		
ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])	ST	n (ST131 [%])		
ST131	6 (13.0%)	ST38	9	ST10	1	ST10	2	ST117	6	ST1196	3	ST1196	3	ST88	1
ST10	4	ST58	5	ST5763	1	ST75	1	ST38	6			ST212	1	ST38	1
ST69	3	ST57	5	ST2040	1			ST131	5 (12.2%)			ST10	1		
ST38	3	ST117	5	ST117	1			ST3778	4			ST3778	1		
ST354	2	ST69	4	ST6008	1			ST429	3			ST57	1		
ST58	2	ST429	3	ST421	1			ST57	3			ST1594	1		
ST453	2	ST2040	3	ST1463	1			ST2040	3			ST2040	1		
ST1844	1	ST68	2					ST420	1						
ST59	1	ST131	2 (3.8%)					ST1158	1						
ST141	1	ST155	2					ST540	1						
ST744	1	ST569	1					ST1196	1						
ST224	1	ST1286	1					ST155	1						
ST4759	1	ST420	1					ST2309	1						
ST23	1	ST10	1					ST162	1						
ST117	1	ST4937	1					ST2458	1						
ST2450	1	ST1818	1					ST354	1						
ST448	1	ST115	1					ST10	1						
ST348	1	ST1594	1					ST212	1						
ST457	1	ST373	1												
ST86	1	ST108	1												
ST1463	1	ST752	1												
ST93	1	ST350	1												
ST648	1	ST354	1												
ST127	1														
ST694	1														
ST115	1														
ST2077	1														
ST393	1														
ST963	1														
ST355	1														
ST362	1														
Total	46		53		7		3		41		3		9		2



**Abbildung 11: Vergleich des Auflösungsvermögens von MLST vs cgMLST anhand der ST131 Klade.** Die Phylogenie basiert links auf den sieben konkatenierten MLST Allelen (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) des klassischen MLST Schemas (Wirth *et al.*) (77). Rechts: Auf den 2 547 Allelen des *ad hoc* cgMLST Schemas basierende Phylogenie.

Sequenztyps (**Abbildung 11**). Die ST-abbildenden Cluster (im Folgenden als cgMLST-ST-Cluster bezeichnet) unterteilten sich aufgrund der höheren Auflösung der cgMLST in Subkladen.

In einigen cgMLST-ST-Clustern wurden dabei nur geringe Alleldistanzen unter den Isolatentypen beobachtet, während in anderen cgMLST-ST-Clustern eine hohe Alleldiversität auftrat (**Abbildung 12**). So zeigten die Isolate des cgMLST-ST-Clusters ST429 eine sehr hohe AllelüberEinstimmung zueinander, während bei den Isolatentypen im cgMLST-ST-Cluster ST10 eine geringe AllelüberEinstimmung der Isolatentypen zu beobachten war (**Abbildung 12**): Es wurden 326 bis 982 Allelunterschiede im paarweisen Vergleich für das cgMLST-ST-Cluster ST10 detektiert.

Grundsätzlich konnte beobachtet werden, dass Isolate eines identischen Ursprungs (Mensch oder Nutztier oder Fleischprodukt) enger zusammengruppierten als Isolate verschiedenen Ursprungs. Ausnahmen bildeten die zwei cgMLST-ST-Cluster ST117 und ST2014, welche ausschließlich Isolate von Nutztieren und Fleischprodukten enthielten, die geringe Alleldifferenzen zeigten. Noch interessanter waren die nahe verwandten Isolate der cgMLST-ST-Cluster ST131 und ST1463, die von Mensch, Nutztier- und Fleischprodukt stammten; so zeigten die ST131 Isolate eine relativ hohe Übereinstimmung in ihren Allelen (15 - 205 Allelunterschiede, **Abbildung 12**). Das Gegenteil wurde bei Isolatentypen von ST38 beobachtet: Der Allelunterschied zwischen humanen und Nutztier/Fleischprodukt-Isolatentypen betrug hier mindestens 513 Allele, während Nutztier- und Fleischprodukt-Isolate des ST38 sich in nur 1 - 190 Allelen voneinander unterschieden. Die höchsten AllelüberEinstimmungen wurden bei Isolatentypen des cgMLST-ST-Clusters ST429 (Nutztier und Fleischprodukte: 0 - 32 Allelunterschiede), und der cgMLST-ST-Cluster-Gruppe ST117-ST3778





### 3.2.1.3.1 Detaillierte SNP-basierte Cluster Analysen

Die cgMLST berücksichtigt im Gegensatz zur klassischen MLST einen erheblich größeren Teil des *E. coli* Genoms. Bedingt durch die hohe rekombinatorische Aktivität von *E. coli* liegt die Größe des Kerngenoms jedoch nur bei ca. 2 500 Genen, die Größe des Pangenoms ist dadurch bedingt jedoch ungleich größer (> 25 000 Gene) bzw. wahrscheinlich nach oben hin offen. Ein typisches *E. coli* Genom verfügt über ca. 5 000 Gene (179, 180). Mehr als die Hälfte dieser Gene kommt jedoch nicht bei allen *E. coli* vor (180). Im eingesetzten cgMLST Schema werden von den ursprünglich 5 202 Genen des Referenzgenoms *E. coli* O157:H7 str. Sakai nur 2 547 Gene bei den vergleichenden Analysen berücksichtigt (48,9 % des Genoms). 2 103 Gene wurden dem *Accessory* Genom zugerechnet und 552 Gene verworfen. Zusätzlich werden beim cgMLST Schema nur kodierende Sequenzabschnitte berücksichtigt, intergenische Regionen werden von der Analyse ausgeschlossen. Bei eng verwandten Isolaten kann dies jedoch bedeuten, dass die Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen durch ein cgMLST Schema nicht ausreichend detailliert ist, um z.B. mögliche Transmissionevents nachweisen zu können. Daher wurde für die Isolate und cgMLST-ST-Cluster, welche in der cgMLST hohe Übereinstimmung zeigten, zusätzlich eine SNP-basierte Verwandtschaftsanalyse durchgeführt. Die Ganzgenom-Rohdaten der Isolate eines jeweiligen STs (ST131, ST1196, ST429 und ST117/3778, ST1463) wurden zu diesem Zweck auf die bestmögliche Referenz aligniert und die SNPs im Anschluss herausgefiltert.

#### 3.2.1.3.1.1 ST117/ST3778 Isolate

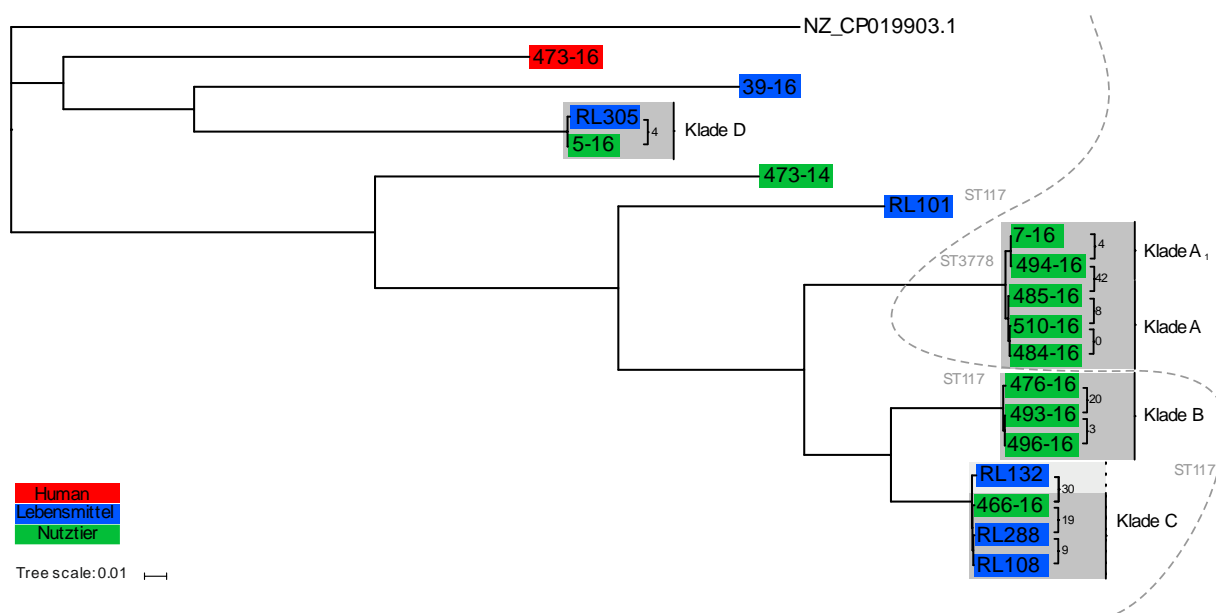
Für die 18 Isolate der Sequenztypen ST117/ST3778 (Unterschied nur im *gyr* Allel; **Tabelle 17**) wurde die Sequenz des *E. coli* Stamms MDR\_56 (GenBank Accession No. NZ\_CP019903.1) als bestmögliches Referenzgenom ermittelt (93,7 % Abdeckung des Referenzgenoms durch Reads von Isolat 473 - 14 bei 94,7 % identischen Basenpositionen). Anhand der SNP-basierten Analyse konnten fünf Kladen identifiziert werden. Die Isolate innerhalb der Kladen wiesen im paarweisen Vergleich nur geringe SNP Unterschiede auf (**Abbildung 13**). Die Topologie des auf den gefilterten SNP Positionen basierenden phylogenetischen Baums war bis auf eine Ausnahme (Isolat 5-16) kongruent zu der Baumtopologie des cgMLST basierten phylogenetischen Baums. Die Isolate der verschiedenen Kladen variierten dabei im paarweisen Vergleich in ihrer genetischen Distanz (0 - 30 SNP Differenz zwischen Isolaten einer jeweiligen Klade). Isolate 510-16 und 485-16 aus Klade A (ST3778) waren identisch, ein drittes Isolat, 484-16, zeigte 4 SNPs Distanz zu den Isolaten 510-16 und 484-16. Die Isolate 485-16 und 510-16 stammten von zwei unterschiedlichen Farmen, die in einer Distanz von 50 km voneinander entfernt liegen; es handelte sich um ein Isolat einer Hühnerkotprobe und ein Isolat einer Umweltprobe einer Schweinefarm aus dem Jahr 2011. Beim dritten Isolat, 485-16, handelte es sich um ein Isolat einer Hühnerkotprobe aus Sachsen-Anhalt aus dem Jahr 2011, welches in einer Distanz von ca. 200 km zu den Farmen der Isolate 485-16 und 510-16 genommen wurde.

Tabelle 17: *E. coli* Isolate der Sequenztypen ST117/3778

Isolat	Material <sup>1</sup>	BL <sup>2</sup>	Jahr der Probenahme	MLST (ST)	AmpC	Weitere Resistenzgene	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> <sup>-</sup> Lokalisation	Klade
5-16	Huhn	NI	2011	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	D
7-16	Huhn	NI	2012	3778	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Incl1 Plasmid	A <sub>1</sub>
39-16	Hühnerfleisch	HE	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	Incl1 Plasmid	-
466-16	Huhn – SK	NI	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	C
473-14	Human	BE	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Incl2 Plasmid	-
473-16	Huhn – SK	NW	2011	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl2 Plasmid	-
476-16	Huhn – SK	ST	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	B
484-16	Huhn – SK	BB	2011	3778	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Incl2 Plasmid	A
485-16	Huhn – SK	ST	2011	3778	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl2 Plasmid	A
493-16	Huhn – SK	BY	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	B
494-16	Huhn – ST	BY	2012	3778	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	A <sub>1</sub>
496-16	Huhn – SK	BY	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	B
510-16	Schwein – UT	BB	2011	3778	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Incl2 Plasmid	A
RL101	Hühnerfleisch	NI	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	-
RL108	Hühnerfleisch	NI	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	C
RL132	Hühnerfleisch	HE	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	C
RL288	Putenprodukt	BY	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	C
RL305	Hühnerfleisch	BY	2012	117	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	Incl1 Plasmid	D

<sup>1</sup>SK – Sammelkot, ST – Sockentupfer, UT – Umgebungstupfer; <sup>2</sup>Bundesland: BE – Berlin, BB – Brandenburg, BY – Bayern, HE – Hessen, NI – Niedersachsen, NW – Nordrhein-Westfalen, ST – Sachsen-Anhalt,

Die verbleibenden ST3778 Isolate sind in Klade A<sub>1</sub> gruppiert (7-16 und 494-16) und unterschieden sich im paarweisen Vergleich um 4 SNPs und um 42 - 47 SNPs zu Isolaten aus Klade A. Isolate des Sequenztyps ST117 unterteilten sich weiterhin in Klade B, C, D und in Einzelisolate. Klade B umfasste die Isolate 496-16, 493-16 und 476-16 (**Abbildung 13**). Insbesondere die Isolate 496-16 und 493-16 zeigten eine Distanz von nur 3 SNPs im paarweisen Vergleich; und Isolat 476-16 zeigte 20 SNPs Differenz zu Isolat 493-16. Alle Isolate aus Klade B wurden aus Hühnerkotproben isoliert, welche im Jahr 2012 in Farmen in Bayern und Sachsen-Anhalt genommen wurden. Klade C enthielt vier Isolate; drei Isolate von Lebensmittelprodukten (Hühnerteile und Pute) und ein Isolat einer Hühnerkotprobe aus dem Jahr 2012. Isolate aus Klade C zeigten im Vergleich zu Isolaten aus Klade A und B größere Differenzen im paarweisen SNP-Vergleich (9 - 31 SNPs). Der Vergleich cgMLST-basierter Analyse / SNP-basierte Analyse ergab Diskrepanzen: Isolate 5-16 (vom Huhn, 2011) und RL305 (Hühnerfleischprobe, 2012) zeigten nur 4 SNPs Differenz während in der cgMLST Analyse eine Differenz von 176 Allelen beobachtet wurde. Diese beobachtete Diskrepanz in der genetischen Verwandtschaft zwischen cgMLST- und SNP-basierter Analyse beruht auf den unterschiedlichen Ausschlusskriterien der beiden Methoden. Die Qualitätsparameter der cgMLST lassen, zu Zwecken der Vergleichbarkeit möglichst vieler Isolate, eine Ambiguität pro Allel zu. In der SNP-basierten Analyse dagegen wird jegliche Ambiguität durch das Tool *SNPfilter* herausgefiltert. Bedingt durch die niedrige Sequenziertiefe des Isolats 5-16 wurden bei der *de novo* Assemblierung relativ viele Ambiguitäten generiert. Treten diese in kodierenden Regionen auf, werden sie bei der cgMLST als neue Allelvariante gewertet und führen so beim paarweisen Vergleich von Isolaten zu einer höheren Alleldifferenz und schlussendlich zu einer veränderten Baumtopologie.

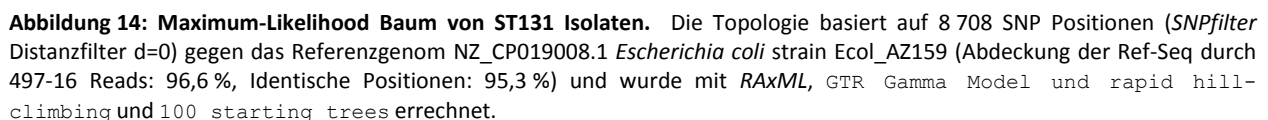


**Abbildung 13: Maximum-Likelihood Baum von ST117/ST3778 Isolat.** Die Topologie basiert auf 10 130 SNP Positionen (*SNPfilter* Distanzfilter d=0) gegen das Referenzgenom NZ\_CP019903.1 *Escherichia coli* Stamm MDR\_56 (Abdeckung der Ref-Seq. durch 473-16 Reads: 93,8 %, identische Basenpositionen: 94,7 %) und wurde mit *RAXML*, GTR Gamma Model und rapid hill-climbing und 100 starting trees errechnet.

### 3.2.1.3.1.2 ST131 Isolate

Das ermittelte bestmögliche Referenzgenom für die 14 identifizierten ST131 Isolate (**Tabelle 18**) war der *E. coli* Stamm Ecol\_AZ159 (GenBank Accession No. NZ\_CP019008.1, 96,6 % Abdeckung des Referenzgenoms durch Reads von 497-16, bei 95,3 % identischen Basenpositionen). Die Topologie des Maximum-Likelihood Baums der ST131 Isolate entsprach der Topologie des cgMLST-basierten phylogenetischen Baums (**Abbildung 14**). Wie aufgrund der cgMLST Analyse erwartet, zeigte Isolat 177-10 in der SNP-basierten Analyse eine große Distanz zu den weiteren ST131 Isolat (3 235 SNPs zum nächsten Isolat 86-16). Bei 177-10 handelte es sich um das einzige ST131 Isolat, welches das *fimH30* Allel trug (siehe ausführliche Beschreibung **Abschnitt 3.2.1.5**). Anhand der Phylogenie konnten zwei Klade identifiziert werden: Klade A umfasste drei sehr ähnliche Isolate, isoliert von Hühnerkotproben aus Bayern (Jahr 2012). Zusätzlich zeigte RL106, ein Isolat vom Hühnerfleischprodukt in 2012, im paarweisen Vergleich eine geringe genetische Distanz (44 - 47 SNPs) zu den Isolat der Klade A. Klade B umfasste Isolate vom Mensch, vom Huhn und ein Lebensmittelisolat. Die SNP Differenzen im paarweisen Vergleich lagen in Klade B zwischen 25 und 53 SNPs. Weitere einzelne Isolate (497-16, 86-16, 590-14, 117-16) wiesen größere Distanz (> 100 SNPs) im paarweisen SNP-Vergleich auf.

<sup>1</sup>SK – Sammelkot, ST – Sockentupfer; <sup>2</sup>Isolationsbundesland: BW – Baden-Württemberg, BY – Bayern, NI – Niedersachsen, HE – Hessen, NW – Nordrhein-Westfalen, ST – Sachsen-Anhalt; <sup>3</sup>nb – nicht bestimmt



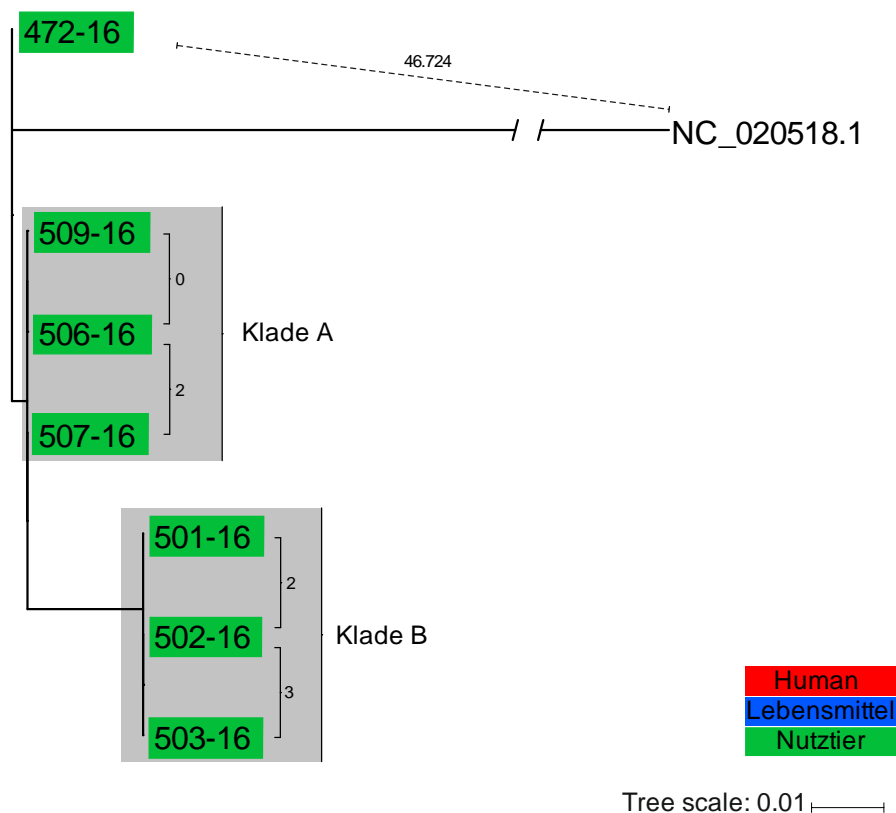
Für die sieben ST1196 Isolate wurde die Genomsequenz des *E. coli* Stamms K-12 subtr. MDS42 (GenBank Accession No. NZ\_020518.1) als bestmögliches Referenzgenom ermittelt (97,4 % Abdeckung des Referenzgenoms durch Reads von Isolat 507-16 bei 90,5 % identischen Basenpositionen). In der phylogenetischen Darstellung der Isolate mittels Maximum-Likelihood-Baum (basierend auf 47 169 SNP-Positionen) konnte die Einordnung der Isolate in zwei Kladen beobachtet werden (**Abbildung 15**). Diese

Baumtopologie entsprach der cgMLST basierten Phylogenie (**Abbildung 12**). Alle ST1196 Isolate stammten von Nutztierproben, gesammelt über die Jahre 2011 - 2014 (**Tabelle 19**). Die jeweiligen Isolate der Klade A und B unterschieden sich im paarweisen Vergleich nur um 0 - 3 SNPs. Isolate der Klade A zeigten 742 - 745 SNPs Differenz zu Isolaten der Klade B. Alle Isolate der Klade A stammten von Putenproben und wurden in der gleichen Region gesammelt (drei unterschiedliche Ställe von zwei Betrieben). Die Proben der Klade B dagegen stammten aus unterschiedlichen geografischen Regionen Deutschlands. Interessanterweise trugen fünf der sieben ST1196 Isolate das Colistinresistenzgen *mcr-1*, welches insgesamt in nur 12 der 164 Isolate dieser Studie nachgewiesen wurde.

**Tabelle 19: *E. coli* Isolate des Sequenztyps ST1196**

Isolat	Material <sup>1</sup>	Isolations- BL <sup>2</sup>	Probenahme- zeitpunkt	MLST (ST)	AmpC	Weitere Resistenzgene	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> - Lokalisation	Klade
472-16	Huhn – SK	NW	2011	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>mcr-1</i>	IncI1 Plasmid	-
501-16	Pute – SK	ST	2014	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Chromosom	B
502-16	Pute – ST	ST	2014	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	Chromosom	B
503-16	Pute – SK	ST	2014	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	Chromosom	B
506-16	Schwein – ST	NW	2011	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	Chromosom	A
507-16	Schwein – ST	NW	2011	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	Chromosom	A
509-16	Schwein – ST	ST	2011	1196	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	Chromosom	A

<sup>1</sup>SK – Sammelkot, ST – Sockentupfer; <sup>2</sup>Isolationsbundesland: NW – Nordrhein-Westfalen, ST – Sachsen-Anhalt



**Abbildung 15: Maximum-Likelihood Baum (MLT) basierend auf allen ST1196 Isolaten.** Die Topologie basiert auf 47 169 SNP Positionen (*SNPfilter* Distanzfilter d=0) gegen das Referenzgenom NC\_020518.1 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MDS42 (Coverage der Ref-Seq durch 507-16 Reads: 97,4 %, Identical Sites: 90,5 %) und wurde mit *RAXML*, GTR Gamma Model und rapid hill-climbing und 100 starting trees errechnet.



#### 3.2.1.3.1.5 ST1463 Isolate

Mittels der cgMLST-basierten Analyse wurden für die zwei ST1463 Isolate unterschiedlichem Ursprungs (RL274 aus Putenfleisch; 1036-14 vom Mensch) eine hohe AllelÜbereinstimmung (19 Allele Differenz) beobachtet. Anhand der SNP-basierten Analyse (bestes *E. coli* Referenzgenom: GenBank Accession No. NC\_020518.1) konnte gezeigt werden, dass die Isolate sich um 21 SNPs voneinander unterschieden.

### 3.2.1.4 Charakterisierung der *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Plasmide und der genetischen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub>

Das Resistenzgen *bla*<sub>CMY-2</sub> liegt bei *E. coli* in der Regel Plasmid-lokalisiert vor. Um den genetischen Kontext von *bla*<sub>CMY-2</sub> in den Studienisolaten zu prüfen, wurden die Ganzgenomdaten der 164 Isolate mit Hilfe des Tools *PlasmidFinder 1.3* auf Plasmid-Replikonsequenzen untersucht und den entsprechenden Replikontypen zugeordnet. Eine Vielzahl an Plasmidreplikon-Sequenzen konnte, in unterschiedlich hoher Anzahl je Isolat, ermittelt werden. In der Summe am häufigsten vertretene Replikons waren: FIB (n=133), FII (n=88), FIA (n=33) und FIC (n=55), I1 (n=81) I2 (n=12), und B/O/K/Z (n=78). Weiterhin wurden X1 (n=29), X4 (n=18), Q1 (n=21), N (n=10), HI2A (n=9), HI2 (n=9), HI1B (n=7), A/C (n=7), HI1A (n=5), Y (n=5), R (n=5) und L/M (n=4) nachgewiesen. In zwei Isolaten konnten keine Replikonsequenzen identifiziert werden. Ein Rückschluss auf die Anzahl der Plasmide je Isolat anhand der ermittelten Plasmid-Replikonsequenzen kann jedoch aufgrund der möglichen Anwesenheit von Multireplikonplasmiden nicht gezogen werden. Ebenso wenig kann anhand der Replikontypen alleine das *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Replikon bestimmt werden.

#### 3.2.1.4.1 Identifizierung des genetischen Hintergrundes von *bla*<sub>CMY-2</sub> und der direkten genetischen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub>

Mit Hilfe weiterer bioinformatischer Methoden (s. folgende Kapitel) konnte schlussendlich jedoch der genetische Kontext von 160 *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Isolaten identifiziert werden. In 76 Isolaten lag *bla*<sub>CMY-2</sub> auf einem IncK Plasmid, in 61 Isolaten auf einem IncI1 Plasmid sowie in 4 Isolaten auf einem IncA/C Plasmid vor. In weiteren 20 Isolaten wurde *bla*<sub>CMY-2</sub> auf dem Chromosom nachgewiesen. Ein Isolat (466-16) offenbarte Sequenzdaten für zwei *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Plasmide (IncK2 und IncI1). Bei vier Isolaten war es nicht möglich den genetischen Kontext von *bla*<sub>CMY-2</sub> zu bestimmen (**Tabelle 21**). Die jeweiligen genetischen Hintergründe von *bla*<sub>CMY-2</sub> sind nicht verknüpft mit der Herkunft der Isolate, d.h. die verschiedenen *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Plasmide kommen in Isolaten von Mensch, Tier und Tierprodukt vor. Im Folgenden werden die jeweiligen genetischen Hintergründe von *bla*<sub>CMY-2</sub> detailliert beschrieben.

Tabelle 2.1: Übersicht des genetischen Kontexts von *bla*<sub>CMV-2</sub> zwischen und innerhalb der unterschiedlichen Reservoirire

Genetischer Kontext von <i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>	pMLST	Referenzplasmid (Accession No.)	Mensch	Nutztier				Fleischprodukt			Total
				Huhn	Rind	Schwein	Pute	Hühnchen	Schwein	Pute	
IncI1	ST12	pCVM29188_101 (NC_011077)	4	12†		1	1	7			25
	ST12	P12-4734_96 (CP012929.1)	1	5				3		3	12
	ST12	unbekannt	2								2
	ST2	pC-6 (KT86369.1)	3	1		1		6	1		12
	ST23		1								1
	ST26		1								1
	ST27									1	1
	ST36			1							1
	ST43		2								2
	ST55				1						1
IncK	ST240		1								1
	ST241			1							1
	ST242		1								1
		pDV45 (KR905384.1)	12	13†		4		25		1	55
IncA/C		pTMSA1088 (KR905386.1)	2	5				8			15
		p486-16		3				3			6
		pSAN1-1736 (CP014658)	2						1	1	4
Chromosom		Chromosomale Integration	6								6
		vermutete chromosomale Integration	5		1	2	1			1	10
		Zweifach vorliegendes <i>bla</i> <sub>CMV-2</sub> : chromosomale Integration und vermutete chromosomale Integration	1			1	2				4
Unbekannt			2					1	1		4
Total			46	41†	2	9	4	53	3	7	165†

† 466-16: trägt ein IncK2 und IncI1 Plasmide mit je *bla*<sub>CMV-2</sub>

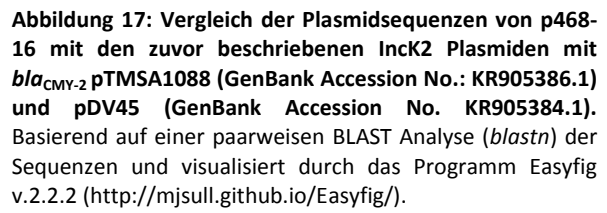


### 3.2.1.4.2 IncK Plasmide

Für 76 *E. coli* Isolate (Mensch n=14; Nutztier n=25; Fleischprodukt n=37) wurde *bla*<sub>CMY-2</sub> in Plasmide vom Replikontyp K nachgewiesen.

Bei 26 dieser 76 Isolate lag die Replikonsequenz von IncK auf dem identischen Contig mit der *bla*<sub>CMY-2</sub>-Sequenz lokalisiert vor. Die Länge der *bla*<sub>CMY-2</sub> und Replikonsequenz beinhaltenden Contigs variierte zwischen 113 498 bp und 60 835 bp. Anhand von BLAST Analysen der 26 Contigs konnte gezeigt werden, dass sieben Contigs mit der Nukleotidsequenz von pTMSA1088 (GenBank Accession No. KR905386.1 – Identische Basenpositionen 99 - 100%, Abdeckung der Referenzsequenz abhängig der Contiglänge bis 99 %) und 17 Contigs mit der Nukleotidsequenz von pDV45 (GenBank Accession No. KR905384.1 – Identische Basenpositionen 99 - 100%, Abdeckung der Referenzsequenz abhängig der Contiglänge bis 100 %) übereinstimmten. Eine vollständige Abdeckung der Nukleotidsequenz durch ein Contigalignment von pTMSA1088 wurde bei sechs Isolaten und von pDV45 bei neun Isolaten erreicht (**Tabelle 22**). Zwei Contigs (von Isolat 486-16 und 488-16) zeigten eine geringe Sequenzübereinstimmung (62 % Abdeckung des besten BLAST-Ergebnis KR905367.1, bei 99 % identische Basenpositionen) mit verfügbaren Sequenzdaten aus der NCBI *nucleotide collection nr/nt*. Ein Alignment aller Contigs von Isolat 486-16 auf das *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Contig von 486-16 führte zu überlappenden Sequenzen an den Contigenden. Anhand des Sequenz-Dotplots wurde an dieser Position ein Ringschluss der Plasmidsequenz vermutet und *in silico* durchgeführt sowie mittels PCR bestätigt. Die Größe des Plasmids von 114,5 kb wurde mittels Makrorestriktionsanalyse (S1-Nuklease PFGE) bestätigt.

Die drei ermittelten *bla*<sub>CMY-2</sub> IncK Plasmidvarianten pDV45 (85,9 kb), pTMSA1088 (79,3 kb) und p486-16 (114,5 kb), hatten eine identische Plasmid-Grundstruktur (**Abbildung 17**). pDV45 und pTMSA1088 unterschieden sich nur in einer 6,5 kb großen Sequenz, welche zwischen den Genen *yfbA* und *psiB* lag, sowie in der Anwesenheit, Orientierung und Anzahl der *Repeats* in der Shufflonregion (**Abbildung A-2**). Plasmidvariante p486-16 hatte eine 28,6 kb zusätzliche Nukleotidsequenz im Vergleich zu pDV45 (**Abbildung 17**). Die Sequenz kodierte für eine TnAs3-ähnliches Transposon, ein trunkiertes IS1326 Element, ein Quecksilberresistenz Operon, sowie Gene eines Plasmid *Maintaining Systems* (*stbAB*) und ein Colicin Operon. Eine Variabilität in der Shufflonregion wurde ebenfalls beobachtet. Shufflonregionen sind biologische „Schalter“, welche eines von sechs oder sieben *pi/V* Genen, die über eine konstante N-terminale Region, aber eine variable C-terminale Region verfügen, kontrollieren und damit das terminale C-Ende der PilV Proteine steuern. Es handelt sich um mehrfache Inversionssysteme (*clustered inversion regions*), welche aus sechs oder sieben Rekombinationsstellen und einem Shufflon-spezifischen Rekombinasegen bestehen (181). Eine Analyse der *incRNAI* Replikonsequenz der Plasmidvarianten zeigte, dass alle Varianten dem neu beschriebenen Replikontyp IncK2 zugeordnet werden konnten (182).



**Abbildung 17: Vergleich der Plasmidsequenzen von p468-16 mit den zuvor beschriebenen IncK2 Plasmiden mit *bla*<sub>CMY-2</sub> pTMSA1088 (GenBank Accession No.: KR905386.1) und pDV45 (GenBank Accession No. KR905384.1). Basierend auf einer paarweisen BLAST Analyse (*blastn*) der Sequenzen und visualisiert durch das Programm Easyfig v.2.2.2 (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>).**

**Tabelle 22: Übersicht über *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende IncK Plasmide in 76 *E. coli* Isolaten**

Plasmid	Größe [bp]	Replikontyp	Anzahl	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> und <i>incRNAI</i> Sequenz auf einem Contig	Vollständig abgedeckte Referenzsequenz
pTMSA1088 (KR905386.1)	79 297	IncK2	55	7	6
pDV45 (KR905384.1)	85 963	IncK2	15	17	9
p486-16	114 511	IncK2	6	2	2

Bei 50 weiteren Isolaten lagen die Sequenzen von *bla*<sub>CMY-2</sub> und IncK getrennt auf unterschiedlichen Contigs vor. Zum Nachweis des Replikontyps und Bestimmung der geeigneten Plasmidreferenzsequenz wurden die *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Contigs mittels *blastn* gegen die NCBI *nucleotide n/r* Datenbank verglichen. BLAST Ergebnisse mit höchster Übereinstimmung waren die Sequenzen der Plasmide pTMSA1088 und pDV45. Eine Übereinstimmung zur Nukelotidsequenz von p486-16 wurde bei vier Isolaten beobachtet. Ein Alignment der Contigs auf die ermittelte Plasmidreferenzsequenz ergab schließlich, bei vollständiger Abdeckung der Referenzsequenz, die Zuordnung zur jeweiligen Plasmidvariante und die Bestätigung des IncK Replikontyps. Isolate mit auf unterschiedlichen Contigs vorliegender *bla*<sub>CMY-2</sub> und Replikonsequenz, wiesen, im Vergleich zu Isolaten mit Replikonsequenz und *bla*<sub>CMY-2</sub> auf identischem Contig, eine höhere Anzahl an (kürzeren) Contigs auf. Ursächlich für diese Diskrepanz waren technisch bedingte, durch repetitive Nukleotidsequenzen verursachte, Abbrüche während der *de novo* Assemblierung. Repetitive Sequenzen können beispielsweise mobile genetische Elemente, wie Insertionssequenzen (IS), sein. Mobile genetische Elemente, insbesondere IS-Elemente, wurden in den Plasmidsequenzen der 50 benannten Isolate beobachtet. Die Insertionselemente der IncK Plasmide wurden mit Hilfe des Tools *ISfinder* identifiziert und sind in **Tabelle 23** aufgeführt.

Die direkte genetische Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub> war bei allen IncK Plasmiden identisch zur vermutlich von *C. freundii* mobilisierten *ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*blc-sugE* Umgebung, wobei *ΔecnR* jedoch nicht vorlag (**Abbildung 18A**) (183). Eine Abweichung in der genetischen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub> wurde bei zwei Isolaten beobachtet: Isolat 66-08 zeigte die Insertion einer *ISKpn26*-ähnlicher Sequenz zwischen *ISEcp1* und *bla*<sub>CMY-2</sub>. In Isolat 35-16 lag, aufgrund einer *ISKpn26* Insertion, *ISEcp1* trunziert vor. Die Funktionalität von *bla*<sub>CMY-2</sub> konnte trotz der abweichenden *upstream* Sequenz von *bla*<sub>CMY-2</sub>, mit Hilfe von Transkonjuganten nachgewiesen werden, welche MHK Werte > 32 mg/l gegenüber Cefotaxim, Ceftazidim und Cefoxitin zeigten.

76 **Tabelle 23: Insertionselemente und jeweilige Position in den *bla*<sub>CMV-2</sub> tragenden Plasmiden**

<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub> Plasmid	Replikontyp	Genbank Referenz	Insertionselement <sup>1</sup>	IS-Familie	Position	IS-Länge in bp	Orientierung	Integration in CDS
p37-06	K2	KR905386.1	IS2-ähnlich (95.72% Ähnlichkeit)	IS3	60 116	1 331	reverse	DNA Primase CDS (ALL42521.1)
pRL98	K2	KR905386.1	IS2-ähnlich (98.12% Ähnlichkeit)	IS3	86 407	1 331	forward	-
p489-16	K2	KR905384.1	IS <i>Ec</i> 62	IS21	26 440	2 125	forward	NikB CDS (ALL42491.1)
p44-16, p45-16	K2	KR905384.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.04% Ähnlichkeit)	IS66	27 973	2 699	reverse	-
p36-16	K2	KR905384.1	IS2-ähnlich (97.67% Ähnlichkeit)	IS3	37 029	1 331	reverse	-
p66-08	K2	KR905384.1	IS <i>Kpn</i> 26-like	IS5	49 343	1 196	reverse	-
p35-16	K2	KR905384.1	IS <i>Kpn</i> 26-like	IS5	49 972	1 196	forward	ISEcp1 CDS (ALL42511.1)
p590-14	K2	KR905384.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.04% Ähnlichkeit)	IS66	77 017	2 699	reverse	Hypothetisches Protein CDS (ALL42540.1)
p701-14	K2	KR905384.1	IS <i>Ec</i> 63-ähnlich (84% Ähnlichkeit)	Tn3	3 549	4 475	reverse	WcaB CDS (ALL42461.1)
p479-16	K2	KR905384.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.05% Ähnlichkeit)	IS66	4 566	2 699	forward	-
p475-16	K2	KR905384.1	IS <i>Sso</i> 4-ähnlich (96.0% Ähnlichkeit)	IS21	20 839	2 459	forward	YgcA CDS (ALL42484.1)
p86-16	K2	KR905384.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.04% Ähnlichkeit)	IS66	11 261	2 699	reverse	YfdA CDS (ALL42472.1)
p8-16, pRL316, pRL320	K2	-	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.0% Ähnlichkeit)	IS66	-	2 699	reverse	TrbC CDS (ALL42492.1)
pRL97	K2	-	IS2-ähnlich (99.55% Ähnlichkeit)	IS3	-	1 331	forward	YagA CDS (BAW89088.1)
p497-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.07% Ähnlichkeit)	IS66	65 056	2 699	forward	Hypothetisches Protein CDS (WP_001164788.1)
p497-16, p464-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.07% Ähnlichkeit)	IS66	32 435	2 699	forward	Einzelstrang- DNA-binding Protein CDS (WP_001276116.1)
p468-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Ec</i> 12	IS21	39 436	2 581	reverse	Hypothetisches Protein CDS (WP_000218847.1)
p483-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS2-ähnlich (95.72% Ähnlichkeit)	IS3	96 404	1 331	reverse	Hypothetisches Protein CDS (WP_001334619.1)
p497-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.04% Ähnlichkeit)	IS66	65 056	2 699	forward	Konjugatives Transferprotein TraT CDS (WP_097570827.1)
pRL303	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.07% Ähnlichkeit)	IS66	99 352	2 699	reverse	Hypothetisches Protein CDS (WP_001303318.1)
pRL281	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Sso</i> 4-ähnlich (96.17% Ähnlichkeit)	IS21	99 209	2 639	forward	Konjugatives Transferprotein TraC CDS (WP_000213862.1)
p504-16	I1 (ST12a)	NC_011077.1	IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.07% Ähnlichkeit)	IS66	24 427	2 699	reverse	ImpB CDS (WP_001566943.1)
p493-16, p469-16	I1 (ST12b)	CP012929.1	IS <i>Ec</i> 12	IS21	36 549	2 581	forward	IS <i>Ec</i> 46-ähnliches Insertionslement
p493-16, p469-16	I1 (ST12b)	CP012929.1	IS903B (96.97% Ähnlichkeit)	IS5	52 083	1 057	forward	-
p493-16, p469-16	I1 (ST12b)	CP012929.1	putatives Transposon ähnliches Element	IS3	66 121	945	-	Konjugatives Transferprotein TraN CDS (WP_001611718.1)
pRL401	I1 (ST12b)	CP012929.1	IS <i>Sbo</i> 1-ähnlich (96.08% Ähnlichkeit)	IS91	12 160	1 709	forward	ISEcp1 CDS (ALL42511.1)
pRL401	I1 (ST12b)	CP012929.1	IS <i>Ec</i> 12	IS21	30 945	2 581	reverse	Hypothetisches Protein CDS (WP_005112260.1)
p52-16	I1 (ST12b)	CP012929.1	2 343 bp Element, putatives Gruppe II Intron ( <i>ltrA</i> )	-	30 827	-	-	Hypothetisches Protein CDS (WP_019842789.1)
p52-16	I1 (ST12b)	CP012929.1	766 bp Element + IS <i>Cro</i> 1-ähnlich (98.04% Ähnlichkeit) +1 864 bp Element, putative Gruppe II Reverse Transkriptase	IS66	31 439	-	forward	Einzelstrang- DNA-binding Protein CDS (ALN31263.1)
p6-16, p53-16, p721-15	I1 (ST2)	KT186369.1	2 343 bp Element putatives Gruppe II Intron ( <i>ltrA</i> )	-	4 308	-	-	Hypothetisches Protein CDS (WP_005112260.1)
pRL304	I1 (ST2)	KT186369.1	IS <i>Ec</i> 62	IS21	59 313	2 125	reverse	Konjugatives Transferprotein TrbC CDS (WP_001430726.1)
pRL225	I1 (ST2)	KT186369.1	IS2-ähnlich (98.12% Ähnlichkeit)	IS3	138 872	1 331	forward	Transkriptions Termination Faktor NusG CDS (WP_001303319.1)
pRL89, pRL225, pRL226, p47-16	I1 (ST2)	KT186369.1	IS <i>Ec</i> 12	IS21	23 623	2 581	reverse	-

<sup>1</sup> mit dem WebTool ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/index.php>) identifizier

### 3.2.1.4.3 IncI1

Plasmide vom Replikontyps IncI1 stellten bei 61 Isolaten den genetischen Hintergrund von *bla*<sub>CMY-2</sub> (**Tabelle A-2**). Bei 30 Isolaten wurde die Replikonsequenz von IncI1 zusammen mit *bla*<sub>CMY-2</sub> auf dem identischen Contig gefunden. Die Länge dieser *bla*<sub>CMY-2</sub> und Replikonsequenz tragenden Contigs variierte zwischen 102 688 bp und 22 378 bp. Eine BLAST Analyse der längsten fünf dieser 30 Contigs ergab eine hohe Übereinstimmung, bis hin zur vollständigen Sequenzabdeckung (Identische Basenpositionen 99 - 100%, Abdeckung der Referenzsequenz abhängig der Contiglänge bis 99 %) von drei Plasmiden: pCVM29188\_101 (*Salmonella enterica* (Huhn, USA, 2003, GenBank Accession No. NC\_011077.1), p12-4374\_96 (Stuhlprobe Mensch, Kanada, 2012, GenBank Accession No. CP012929.1) und pC-6 (*E. coli*, Urinprobe Mensch, Dänemark, 2009, GenBank Accession No. KT186369.1) (**Tabelle 24**).

**Tabelle 24: Übersicht über IncI1 Plasmide**

Plasmid	Länge [bp]	Replikontyp*	Anzahl	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> und <i>incRNAI</i> Sequenz auf einem Contig	Vollständig abgedeckte Referenz-Sequenz
pCVM29188_101 (NC_011077.1)	101 461	IncI1-pST12a	27	20	1
p12-4374_96 (CP012929.1)	96 042	IncI1-pST12b	12	6	2
pC-6 (KT186369.1)	90 486	IncI1-pST2	12	4	1

\*Angegeben sind Replikontyp und pST

Für die verbleibenden 31 Isolate ohne *bla*<sub>CMY-2</sub>-Replikonsequenz-Link auf einem Contig wurde die Plasmidsequenzähnlichkeit der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden Contigs durch ein Sequenzalignment auf die IncI1 Plasmidreferenzen ermittelt. Insgesamt wurden damit bei 27 Isolaten Plasmidsequenzen identisch zu pCVM29188\_101, bei 12 Isolaten Plasmidsequenzen identisch zu p12-4374\_96 und bei weiteren 12 Isolaten Plasmidsequenzen identisch zu pC-6 identifiziert (**Tabelle 21**).

Aufgrund der hohen Verbreitung und Diversität von IncI1 Plasmiden existiert für diesen Plasmidtyp ein zusätzliches Typisierschema, die pMLST (157). Die pST der Isolate wurden mit Hilfe des Tools *pMLST 1.4* bestimmt (157). Am häufigsten vertretener pST der IncI1 Plasmide war pST12 (n=39), gefolgt von pST2 (n=12) und pST43 (n=2). Die pST pST23, pST26, pST27, pST36, pST55, pST240, pST241 und pST242 wurden je einmal beobachtet.

Plasmide identisch zu pCVM29188\_101 und p12-4374\_96 gehörten pST12 an. Eine detaillierte Sequenzanalyse der beiden Plasmidvarianten zeigte, dass sich die Plasmide eine identisches Plasmidgrundstruktur teilten, welches sich jedoch in der Integrationsstelle von *bla*<sub>CMY-2</sub> unterschied: Das *bla*<sub>CMY-2</sub>

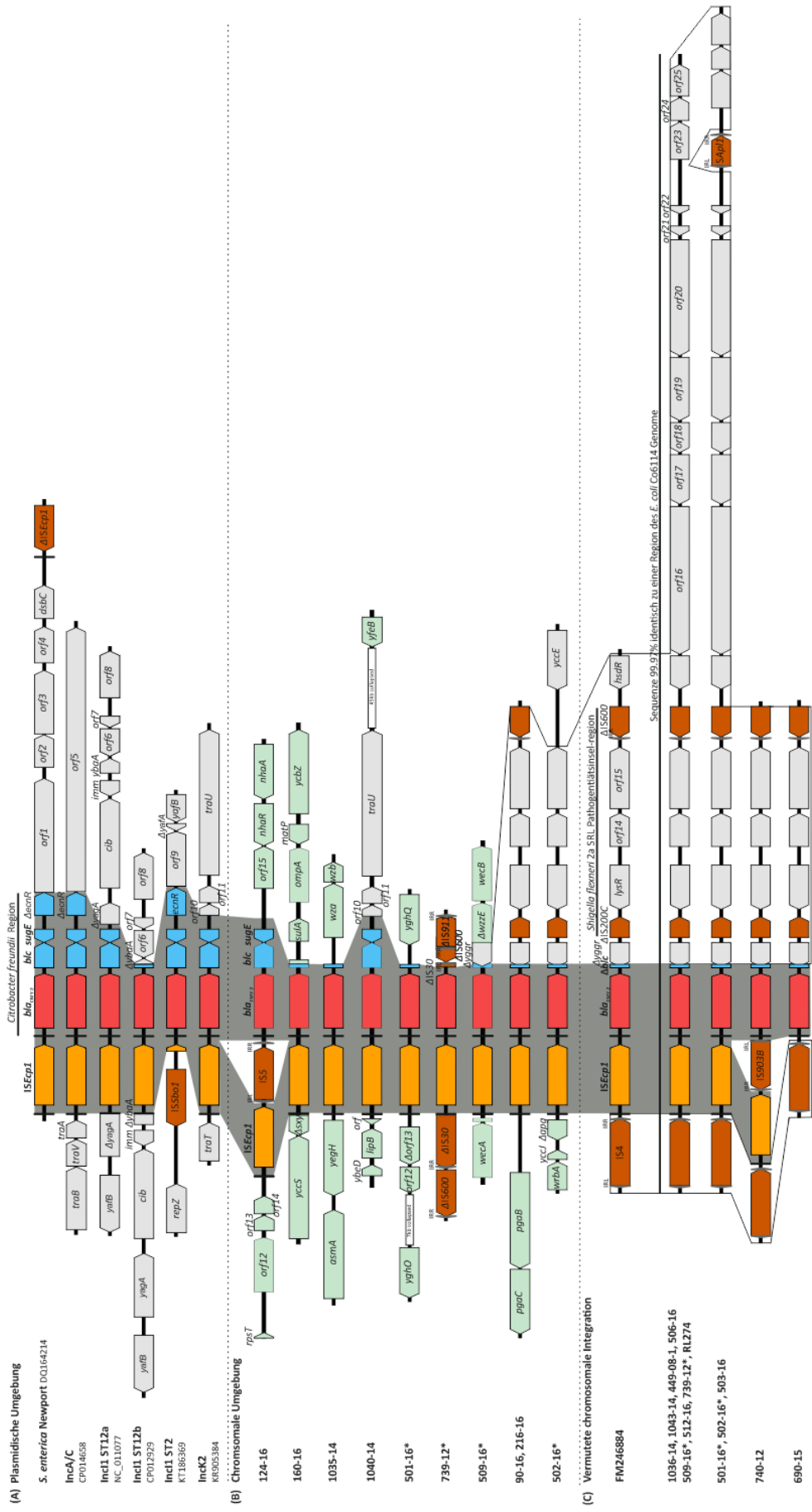


Abbildung 18: Direkte genetische Umgebung von *bla<sub>CMV-2</sub>* der Studienisolate.

*ISEcp1* und der konservierte *Citrobacter freundii*-like chromosomale Bereich (*bla<sub>CMV-2</sub>*, *blc*, *sugE* und *ecnR*) sind grau hinterlegt. Der Farbcode der dargestellten Gene ist wie folgt: *ISEcp1* in orange, *bla<sub>CMV-2</sub>* in rot, *blc*, *sugE* und *ecnR* in blau, Insertionselemente (IS) in braun, chromosomale *E. coli* Gene in schwach grün. Die schwarzen Rechtecke implizieren *inverted repeats* von *ISEcp1*, *inverted repeats* der weiteren IS-Elemente sind durch graue Dreiecke gekennzeichnet.

(A) Plasmidale vorliegende Varianten der genetischen Umgebung von *bla<sub>CMV-2</sub>* der verschiedenen Plasmid-Backbones (*IncA/C* (CP014658), *IncK2* (KR905384), *IncL1-ST2* (KT186369), *IncL1-ST12a* (NC\_011077), *IncL1-ST12b* (CP012929)) im Vergleich zur *bla<sub>CMV-2</sub>* Sequenz von *S. enterica* serovar Newport (DQ164214).

(B) Varianten der chromosomal vorliegenden genetischen Umgebung von *bla<sub>CMV-2</sub>*. Isolate mit einer zweiten, putativ chromosomalen Kopie von *bla<sub>CMV-2</sub>* sind durch einen Stern

Sequenzfragment von pCVM29188\_101 bestand aus einem 3 915 bp langen *ISEcp1-bla<sub>CMY-2</sub>-blc-sugE* Komplex, welcher in *yagA* integrierte. Der *bla<sub>CMY-2</sub>*-tragende Komplex von Plasmid p12-4374\_96 war 3 123 bp lang und setzte sich aus der kodierenden Nukleotidsequenz von *ISEcp1-bla<sub>CMY-2</sub>-Δblc* (trunkiert, 65 bp lang) zusammen und inserierte in einen ORF für ein hypothetisches Protein (**Abbildung 18**). Zusätzlich wurde in der Plasmidsequenz von pCVM29188\_101 ein Toxin-Antitoxin-System (*ccdA*) kodierender Sequenzabschnitt nachgewiesen. Zur besseren Unterscheidung werden diese beiden Varianten von pST12 im Folgenden als IncI1-pST12a (pCVM29188\_101) und IncI1-pST12b (CP01292.1) bezeichnet (**Tabelle 24**).

Bei den 27 Isolaten mit Plasmiden mit hoher Ähnlichkeit zu pCVM29188\_101 (IncI1-pST12a) lag der einzige Unterschied zu pCVM29188\_101 in der Abwesenheit eines 2 462bp großen *ISEc22* Element in der Pilus Region. Bei acht Isolaten wurden zudem noch Insertionen von MGEs in das Plasmid-Rückgrad an unterschiedlichen Positionen beobachtet (**Tabelle 23**). Plasmide der Variante IncI1-pST12b (n=12) zeigten ebenfalls eine hohe Sequenzähnlichkeit (93,7 - 99,9 % Identität im paarweisen Vergleich) zum ermittelten Referenzplasmid p12-4374\_96. Bei fünf dieser Plasmide traten MGE Insertionen an unterschiedlichen Positionen in der Plasmidgrundstruktur auf (**Tabelle 23**).

IncI1-pST2 war mit 12 *bla<sub>CMY-2</sub>*-tragenden Plasmiden der zweithäufigste pST (**Tabelle A-2**). Plasmide dieses pST zeigten eine hohe Sequenzähnlichkeit (96,7 - 99,9 % Identität im paarweisen Vergleich) zum Plasmid pC-6. In 9 von 12 Plasmiden der Studienisolate wurden zusätzliche Insertionen von MGEs beobachtet (**Tabelle 23**). Bemerkenswert war die Insertion von *ISEc12* an identischer Stelle in der Plasmidgrundstruktur (ORF für ein hypothetisches Protein) bei Plasmiden aus fünf Isolaten des Sequenztyps ST58 (RL89, RL225, RL226, 47-16).

Die Plasmidsequenzen der weiteren, nicht pST12 und pST2 zugehörigen IncI1 Plasmide, wurden nicht rekonstruiert. Eine Sequenzanalyse der direkten genetischen Umgebung von *bla<sub>CMY-2</sub>* zeigte jedoch, dass bei allen diesen Isolaten der identische *ISEcp1-bla<sub>CMY-2</sub>-blc-sugE* Komplex vorlag.

#### 3.2.1.4.4 IncA/C

Bei vier Isolaten lag die Replikonsequenz von IncA/C zusammen mit *bla<sub>CMY-2</sub>* auf einem identischen Contig vor. BLAST-Analysen dieser Contigs zeigten hohe Ähnlichkeit zu einem 160 kb IncA/C Plasmid (pSAN1-1736) eines *Salmonella enterica* Isolates (GenBank Accession No. CP014658.1). Ein Alignment der Contigs auf die Sequenz von pSAN1-1736 ergab eine 90,6 %ige Abdeckung der Referenzsequenz bei 98,9 % Nukleotidsequenzähnlichkeit. Repräsentativ wurde für Isolate mit IncA/C Plasmiden eine *bla<sub>CMY-2</sub>* Transkonjugante von Isolat 761-14 angefertigt. Mittels Makrorestriktionsanalyse (S1-Nuklease PFGE) wurde die Plasmidgröße dieser Transkonjugante mit IncA/C Plasmid auf ca. 170 kb geschätzt.

#### 3.2.1.4.5 Chromosomale und vermutet chromosomale *bla*<sub>CMY-2</sub> Integration

Da bei 20 Isolaten keine oder nur nicht passende Plasmidreplikonsequenzen gefunden wurden, wurde eine chromosomale Lokalisation von *bla*<sub>CMY-2</sub> vermutet (**Tabelle A-2**). Ein Transfer von *bla*<sub>CMY-2</sub> in *E. coli* K12 J53 mittels Konjugationsassays war bei allen 20 Isolaten erfolglos. Für zehn dieser 20 Isolate konnte die Lokalisation von *bla*<sub>CMY-2</sub> auf dem Chromosom direkt anhand von Sequenzanalysen bestätigt werden: Chromosomale Nukleotidsequenzen von *E. coli* lagen unmittelbar neben Fragmenten der *bla*<sub>CMY-2</sub> Nukleotidsequenz auf identischen *Reads* vor. Die Rekonstruktion der umgebenden Sequenzen ergab, dass bei acht Isolaten eine *bla*<sub>CMY-2</sub> Integration an unterschiedlichen Positionen im Chromosom stattfand. Zwei weitere Isolate (90-16 und 216-16) hatten eine identische Integrationsstelle (**Abbildung 18B**).

Während der Sequenzanalyse wurde bei vier Isolaten eine doppelt so hohe *Readabdeckung* (Sequenziertiefe) von *ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*Δblc* im Vergleich zu den flankierenden chromosomalen Nukleotidsequenzen beobachtet.

Die *Reads upstream* von *ISEcp1* und *downstream* von *Δblc* *Reads* beinhalteten plasmidale und chromosomale Nukleotidsequenzen. Eine Differenzierung der *Reads* ergab schließlich, dass es bei diesen Isolaten zum einen zu einer plasmidalen Lokalisation von *bla*<sub>CMY-2</sub> und zum anderen zu einer zusätzlichen putativ chromosomalen Integration des *bla*<sub>CMY-2</sub> Komplexes kam. Diese zusätzliche putative chromosomale Integration zeigte bei allen vier Isolaten eine identische Sequenz und wurde ebenso in acht weiteren Isolaten nachgewiesen (**Abbildung 18B**). Der putative chromosomale *bla*<sub>CMY-2</sub> Komplex (*ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*Δblc-ΔyggR*) wurde *upstream* von IS4 flankiert, während *downstream* eine Nukleotidsequenz ähnlich einer *Shigella flexneri* 2a SRL Pathogenitätsinsel-Region (95 % Sequenzähnlichkeit) vorlag (**Tabelle 25** und **Abbildung 18C**). Die gesamte Struktur war identisch zur genetischen Umgebung des *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Elements TN44889 (GenBank Accession No. FM246884) (183). Fang *et al.* zeigten, dass dieses Element bei *E. coli* chromosomal vorliegen kann (184). Ein identischer *bla*<sub>CMY-2</sub>-Komplex wurde weiterhin im *Draft Genome* von *E. coli* Co6114 identifiziert (185). Hier schloss sich *downstream* von *hsdR* ein zusätzlicher, elf ORFs beinhaltender Sequenzabschnitt an, welcher mit einer 99,97 %igen Sequenzidentität ebenfalls in den Studienisolaten identifiziert wurde. Aufgrund der mobilen genetischen Elemente war eine Ermittlung der Integrationsstelle dieses *bla*<sub>CMY-2</sub>-Komplexes ins Chromosom bioinformatisch nicht möglich. Die Abwesenheit von plasmidalen *Reads* und Replikonsequenzen, sowie die hohe Ähnlichkeit zu TN44889 und *E. coli* Co6114 und die negativen Konjugationsassays deuten jedoch auf eine chromosomale Integration hin.



**Tabelle 25: Aufteilung der chromosomalen Integration von *bla*<sub>CMY-2</sub> in gesicherte und einzigartig auftretende chromosomale Positionen und in die putativ chromosomalen TN44889-identischen Fragmente**

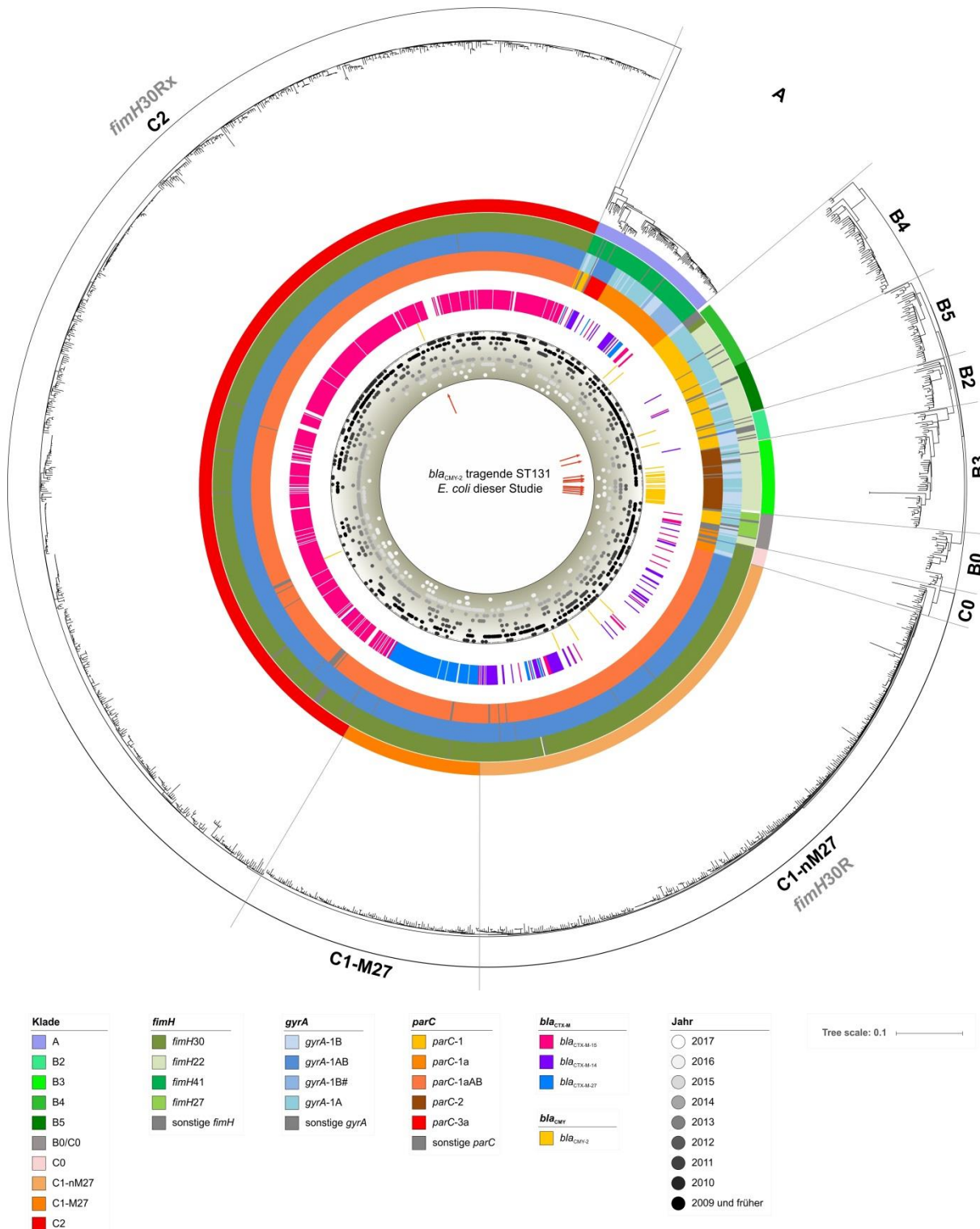
Isolat	Quelle	Chromosomale Lokalisation von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>				
		Chromosomal vorliegend (einzigartige Integrationsstellen*)	Zwei Kopien von <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> vorliegend	Umgebung identisch zu TN44889 und <i>E. coli</i> Co6114 Fang <i>et al.</i> , Verdet <i>et al.</i> , Both <i>et al.</i> (183-185)		
				identisch zu TN44889	mit IS <i>API1</i> Element	mit veränderter IS <i>Ecp1</i> Sequenz
1035-14	Human	+				
1036-14	Human			+		
1040-14	Human	+				
1043-14	Human			+		
124-16	Human	+				
160-16	Human	+				
216-16	Human	+				
449-08-1	Human			+		
501-16	Pute	+	+		+	
502-16	Pute	+	+		+	
503-16	Pute				+	
506-16	Schwein			+		
509-16	Schwein	+	+			
512-16	Schwein			+		
690-15	Human					+
739-12	Human	+	+	+		
740-12	Human					+
90-16	Human	+				
RS274	Putenschnitzel			+		

\*Die chromosomale Integrationsstelle ist bei den Isolaten 216-16 und 90-16 identisch

### 3.2.1.5 Analyse der Populationsstruktur von ST131-*E. coli* Isolaten

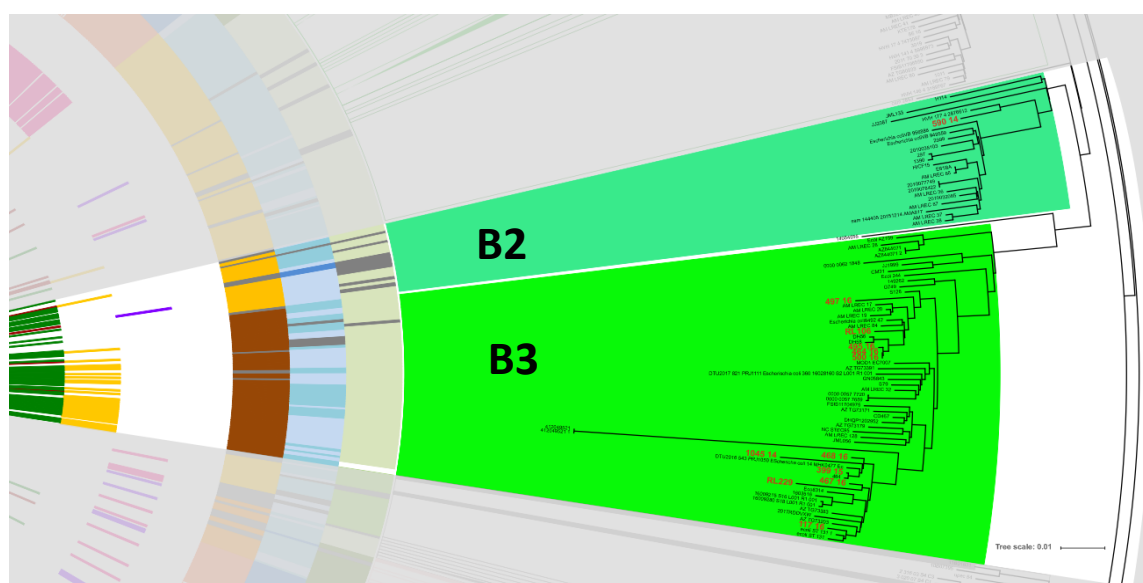
Aufgrund seiner Relevanz als pandemisch auftretender Klon wurden, zusätzlich zur cgMLST, die ST131-*E. coli* Isolate auf Basis des Typ 1 Fimbrien-Adhäsins *fimH* Allels subtypisiert. Die Analyse zeigte, dass, mit einer Ausnahme, alle CMY-2-produzierenden *E. coli* dieser Studie das *fimH*22 Allel trugen. Einziges Isolat mit abweichendem *fimH* Allel war ein Isolat vom Mensch (177-10) mit Allel *fimH*30. Die *E. coli*-ST131 Populationsstruktur kann neben der *fimH* Allel Einteilung weiterhin durch Allelvarianten der DNA-Gyrase Untereinheit A *gyrA* und Topoisomerase IV Untereinheit A *parC* unterteilt werden. *E. coli* mit *fimH*22 Allel bilden phylogenetisch innerhalb der *E. coli*-ST131 Population die Klade B, welche sich, in Abhängigkeit der vorliegenden *gyrA* und *parC* Allele, weiterhin in die Klade B1-B5 aufspaltet. Isolate mit Allel *fimH*30 werden dagegen der Klade C zugeordnet. Diese Klade spaltet unter anderem weiter in die Subklade C1 (*H*30-R) und C2 (*H*30-Rx) auf. Charakteristisch für Subklade C2 Isolate ist die Anwesenheit des ESBL Gens *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Die Sequenzdaten von Isolat 177-10 trugen die entsprechenden *gyrA* und *parC* Allelvarianten und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> für Klade C2. Zusätzlich wurden bei diesem Isolat Replikonsequenzen für IncF Plasmidreplikons, nicht aber für IncK und IncI1 Plasmidreplikons nachgewiesen. IncF in Kombination mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub> wird mit Klade C2 assoziiert. Die Allelvariante *fimH*41

(Klade A) wurde in der Sammlung der *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden *E. coli* nicht nachgewiesen. Verglichen mit bisherigen Studien ist der Anteil an ST131 bei CMY-2-produzierenden *E. coli* verhältnismäßig hoch (186-188).



**Abbildung 19: Populationsstruktur von *E. coli* ST131.** Die Phylogenie des Neighbour-Joining-Tree basiert auf 2 547 Allelen des *E. coli* *ad hoc* cgMLST Schema. Die kladenspezifische Marker *gyrA*, *parC* und *fimH*, IncK und Inc1 Plasmidreplikonsequenzen und *bla*<sub>CTX-M</sub> und *bla*<sub>CMY</sub> sind farbkodiert in den inneren Ringen dargestellt. Die Kladenzugehörigkeit der ST131 Population ist außerhalb dargestellt.

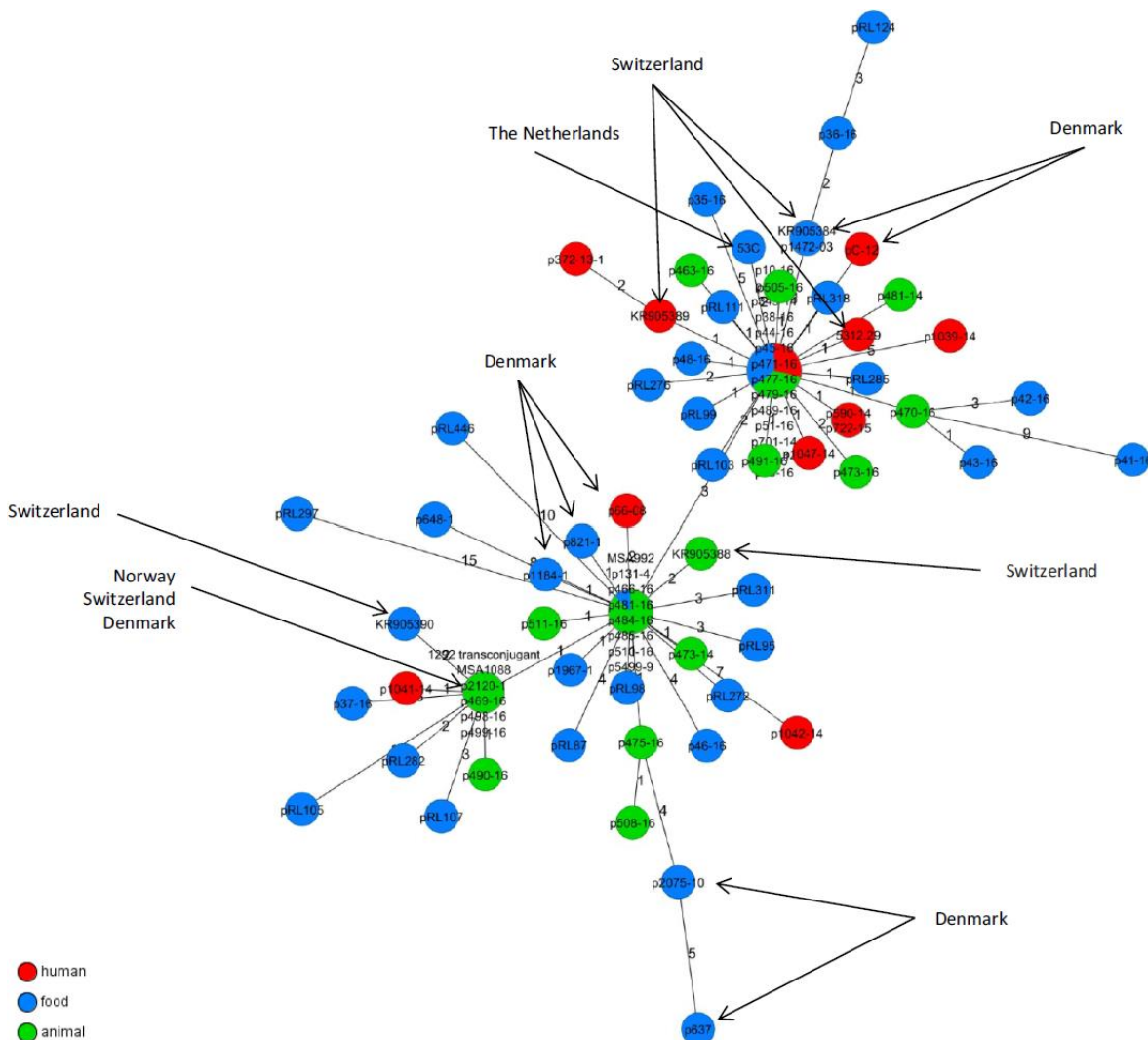
Um die ST131 aus Deutschland in einen internationalen Kontext zu setzen wurden die Ganzgenomdaten der ST131-Studienisolate mit veröffentlichten ST131 Ganzgenomsequenzen verglichen. Hierfür wurden verfügbare Ganzgenomdatensätze von *E. coli*-ST131, isoliert in den Jahren 2000 - 2017, von der Plattform Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) genutzt. Insgesamt wurden 1 371 Datensätze in die Analyse eingeschlossen (Stand Januar 2018). Die Ganzgenomsequenzen wurden mit Hilfe des *ad hoc* cgMLST Schemas dieser Studie typisiert. Aus **Abbildung 19** ist ersichtlich, dass der größte Teil der analysierten *E. coli* Genome in die Subkladen C2, C1-M27 und C1-nM27 fiel. Diese Klade umfassen den weltweit am weitesten verbreiteten Klon *E. coli*-ST131 Serotyp O25b:H4, welcher mit Fluorchinolonresistenz und im Fall der Klade C2 zusätzlich mit dem ESBL Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> assoziiert ist. Die entsprechenden *gyrA* und *parC* Allele und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> wurden bei allen Isolaten bestätigt. Neben Klade C wurden ebenfalls Isolate in den Kladen A und B beobachtet. Die meisten Studienisolate gruppieren, wie zuvor beschrieben, aufgrund der *fimH* Allele in Klade B und fallen hier aufgrund der *parC* und *gyrA* Allele in Klade B3, sowie in zwei Fällen in Klade B2. Klade B3 wird durch die Allele *fimH*22, *parC*-2 und *gyrA*-1A/*gyrA*-1B und Klade B2 durch *fimH*22, *parC*-1 und *gyrA*-1A/*gyrA*-1B definiert (101). Von den 1 371 bezogenen *E. coli* Genomen wurde bei 25 *E. coli bla*<sub>CMY-2</sub> identifiziert. Bis auf wenige Ausnahmen (ein Isolat in Klade C2, vier Isolate in Klade C1 und je ein Isolat in Klade A und B4) gruppieren diese CMY-2-positiven Isolate (n=18), in Übereinstimmung mit den Studienisolaten, in Klade B3. Zusätzlich tragen 14 dieser 18 Isolate Replikonsequenzen für IncI1 Plasmide, sowie in zwei Fällen IncK Replikonsequenzen (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20:** Ausschnitt aus der Populationsstrukturanalyse von *E. coli* ST131 in Klade B2 und B3. Im innersten Kreis farblich markiert ist der Nachweis von Replikonsequenzen von IncI1 (grün) und IncK (braun), im nächst inneren Ring ist der Nachweis von *bla*<sub>CMY-2</sub> (gelb) markiert. Studienisolate sind in roter Schrift markiert. Für die weitere Legende siehe Abbildung 19.

### 3.2.1.6 Vergleich von IncK2 Plasmiden verschiedener Herkunft

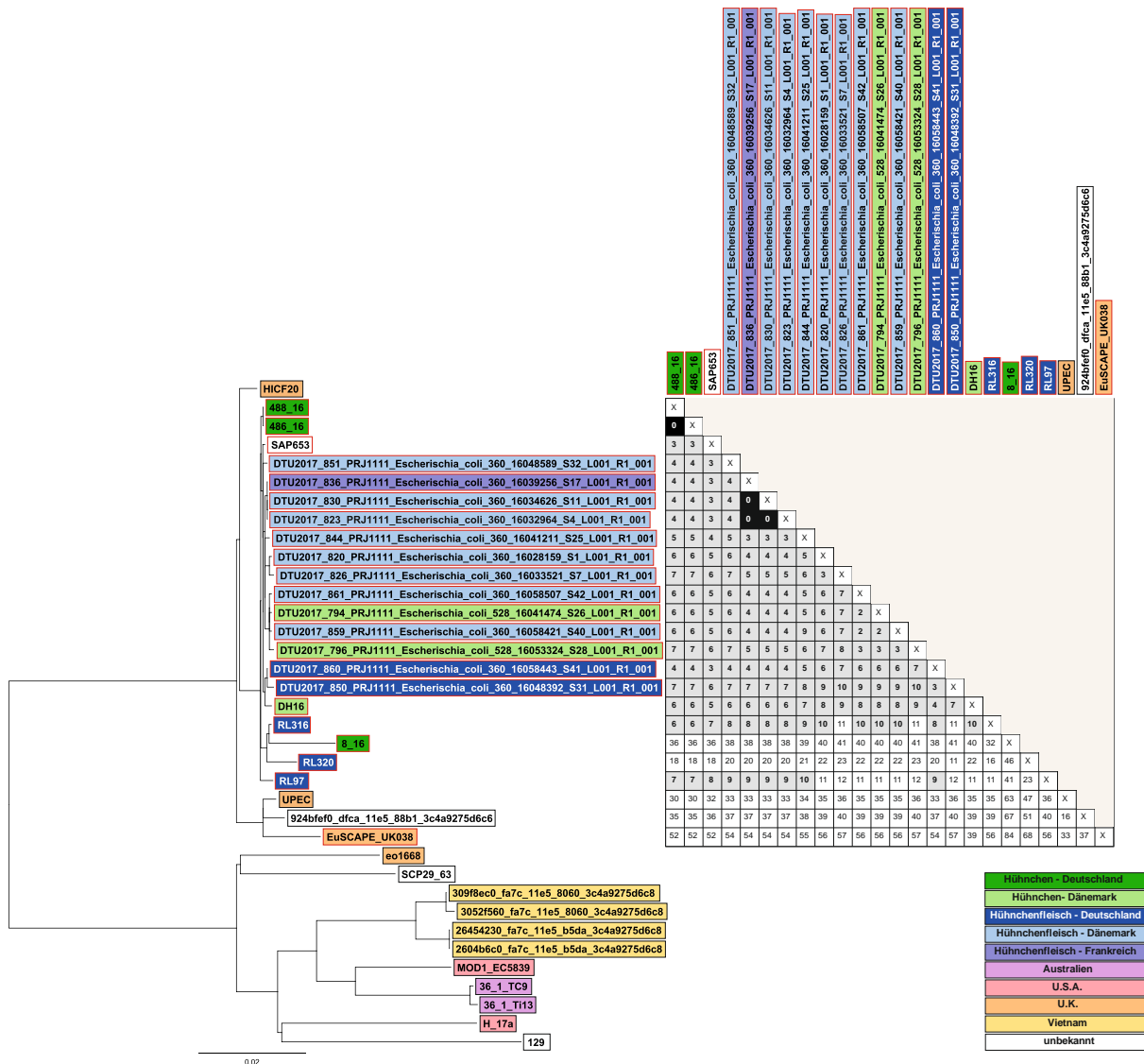
Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der IncK2 Plasmide wurden, um Aussagen über die länderübergreifende Verbreitung der Plasmide treffen zu können, die IncK2 Plasmidsequenzen der Studienisolate mit weltweit veröffentlichten IncK2 Plasmidsequenzen verglichen. Anhand eines paarweisen Gen-zu-Gen-Vergleichs, analog zur Methodik der cgMLST, wurden 67 Gene der Plasmide untersucht und in Allelvarianten eingeteilt. **Abbildung 21** zeigt, dass der Großteil der Plasmide untereinander sehr ähnliche bis identische Gene aufwies und dementsprechend geringe Unterschiede in den Alleldistanzen beobachtbar waren. Die höchste beobachtete, paarweise Alleldifferenz betrug 25 Allele. Verglichen mit dem Rest der untersuchten Plasmide stellte diese hohe Differenz aber einen Ausreißer dar (mittlere paarweise Alleldistanz 6,25). Auffällig war, dass Plasmide aus Isolaten von Mensch, Nutztier und Lebensmittel teilweise identische Allelkombinationen zeigten. Die in die Analyse eingeschlossenen Plasmide aus anderen Studien zeigten nur geringfügige bis keine Abweichungen zu den Plasmidsequenzen aus Deutschland.



**Abbildung 21: Minimum-Spanning-Tree der *bla*<sub>CMY-2</sub>-IncK2-Plasmide.** Die Phylogenie basiert auf einem paarweisen Gen-zu-Gen-Vergleich der gemeinsam vorkommenden Gene. 67 Gene wurden in den Vergleich eingeschlossen. Das Herkunftsland der zusätzlich eingeschlossenen Plasmidsequenzen ist angegeben.

### 3.2.1.7 ST429 Analyse

Wie schon in den **Abschnitten 3.2.1.3.1.4** und **3.2.1.4.2** erörtert, zeigten die Isolate vom Sequenztyp ST429 geringe Unterschiede in der SNP-basierten Analyse und mit p486-16 in allen Isolaten ein distinktes Plasmid. Um einen Überblick über die Verbreitung dieser klonalen Linie im größeren Kontext zu erhalten, wurden alle verfügbaren Genomsequenzen des Sequenztyps ST429 von der Plattform EnteroBase (56 ST429 gelistet Isolate, davon waren 30 Genomsequenzen verfügbar) bezogen und mit Hilfe des *E. coli ad hoc* cgMLST Schemas mit den Studienisolaten verglichen. Zusätzlich wurden die bezogenen Ganzgenomsequenzen auf Anwesenheit der p486-16-Sequenz überprüft. In **Abbildung 22** ist die phylogenetische Einordnung der Studienisolate in den Kontext aller verfügbaren ST429 Genomsequenzen dargestellt. Die Studienisolate aus Deutschland gruppieren eng mit Isolaten aus Dänemark (und in einem Fall Frankreich) zusammen. Bis auf zwei Ausnahmen wurde in den aus Dänemark stammenden Sequenzdaten *bla*<sub>CMY-2</sub> in einer p486-16 ähnlichen Plasmidstruktur identifiziert. Zusätzlich wurde eine EnteroBase cgMLST Analyse auf der Grundlage aller der Plattform verfügbaren Genomsequenzen von ST429 Isolaten durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Isolate mit hoher Ähnlichkeit ebenfalls von Lebensmittelproben aus Luxemburg und Frankreich isoliert wurden (**Abbildung A-5**).



**Abbildung 22: Neighbour-Joining-Tree aller verfügbaren *E. coli* ST429 Isolate.** Die Phylogenie basiert auf dem 2 547 Allel-beinhaltenden *E. coli ad hoc* cgMLST Schema. In die Analyse einbezogene Sequenzdaten stammen aus dieser Studie und wurden von Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>). Sequenzdaten von Enterobase wurden als *de novo* Assemblies bezogen. Die Genbank Accession No. der inkludierten Isolate lauten: ERR2091318, ERR209121, ERR2091324, ERR2091328, ERR2091334, ERR2091342, ERR2091342, ERR2091348, ERR2091349, ERR2091357, ERR2091358, ERR2091419, ERR2091421, DRR102690, SRR3050857, SRR3098809, SRR3987496, ERR1619552, ERR1622238, ERR1622239, ERR1622406, ERR1622406, ERR1622407, ERR1595423, ERR1543414, ERR277049, ERR1415546, ERR1163310, ERR435146, SRR2000414. Alle Sequenzen wurden auf die Anwesenheit von *bla*<sub>CMY-2</sub> und *IncK2* RNAi Sequenzen analysiert und positive Isolate rot markiert. Alle Sequenzdaten mit *bla*<sub>CMY-2</sub> zeigten Ähnlichkeit zum Plasmid p486-16. Die paarweisen Alleldistanzen der Isolate sind in der Matrix angegeben.

### 3.3 Fitness Studie - Experimentelle Untersuchungen zur bakteriellen Fitness nach Erwerb von ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-Gen-tragenden Plasmiden und Analyse möglicher Ursachen der Fitnesskompensation

#### 3.3.1 Konjugation und Transkonjuganten

Im Rahmen der Fitness Studie wurde zunächst eine Sammlung isogener Stämme mit verschiedenen Resistenzplasmiden konstruiert. Durch ein Konjugationsassay im Flüssigmedium wurde versucht die Resistenzplasmide der Isolate aus **Tabelle A-5** in den Rezipientenstamm *E. coli* K12 J53 zu übertragen. Insgesamt konnten 14 verschiedene Plasmide erfolgreich in den Rezipientenstamm transferiert werden (**Tabelle 26**). Die übertragenden Plasmide variierten in ihrer Größe von 77 - 250 kb und gehörten verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen an. Das übertragene Resistenzgen wurde mittels PCR und der Replikontyp mittels PRBT bestätigt. Die Antibiotikaempfindlichkeitstestung (Mikrobouillondilutionsmethode) bestätigte den resistenten Phänotyp der Transkonjuganten.

**Tabelle 26:** Hergestellten Transkonjuganten mit jeweiligem  $\beta$ -Laktamasegen, Plasmidtyp und Plasmidgröße, sowie der Spezies des Donorstamms.

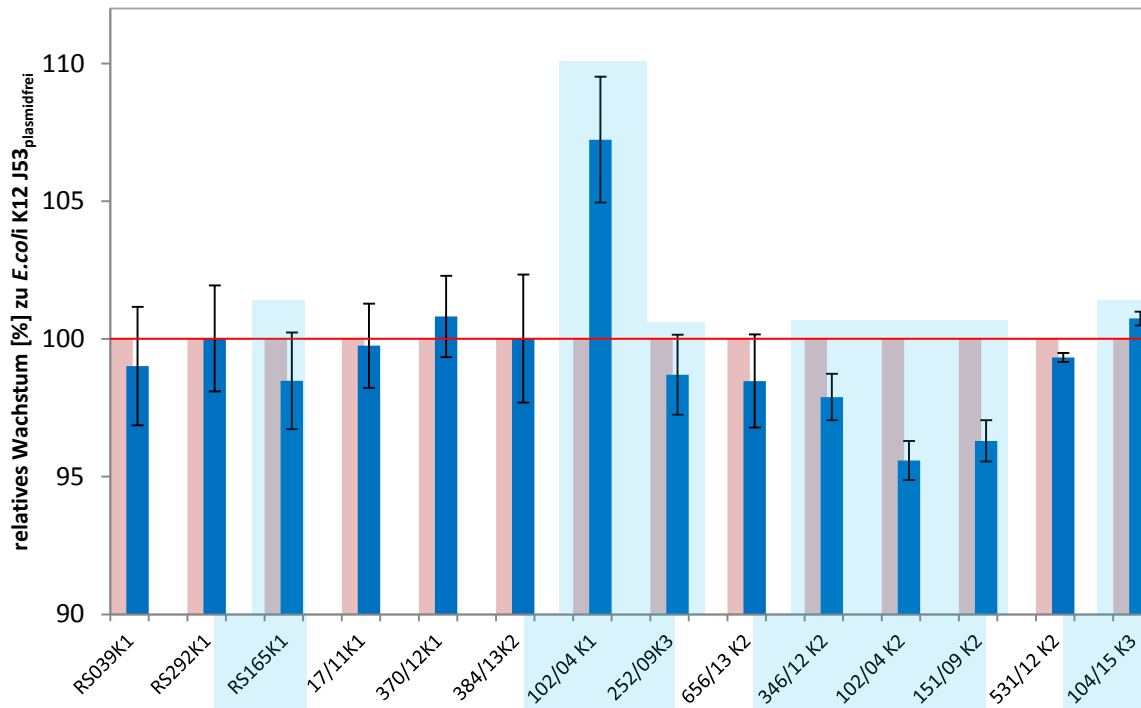
Isolat	Wildtypspezies	$\beta$ -Laktamase Gen	Plasmidgröße [kb]	Replikon Typ
RS039 K1	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	80	IncI1
RS292 K1	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	80	IncFII
17/11 K1	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	190	IncA/C
370/12 K1	<i>K. oxytoca</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	250	IncFIB
384/13 K2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	110	IncFII
656/13 K2	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	90	IncI1
531/12 K2	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	90	IncI1
252/09 K3	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	85, 60	IncI1, IncFII
346/12 K2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	60	IncL/M-1
RS165 K1	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	70	IncFII
151/09 K2	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	100	IncN/IncR
104/15 K3	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	77	IncF
102/04 K1	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CMY-16</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	160	IncA/C
102/04 K2	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CMY-16</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	160	IncA/C

#### 3.3.2 Wachstumsvergleiche der Transkonjuganten

Im nächsten Schritt wurde die initiale relative Fitnesslast der Transkonjuganten nach Plasmidaufnahme durch Wachstumsversuche ermittelt. Die relative Fitnesslast wurde in Prozent [%] angegeben und ergab sich durch den Quotienten der Wachstumsraten  $\mu_{\text{average}}$  der jeweiligen Transkonjuganten dividiert durch die Wachstumsrate  $\mu_{\text{average}}$  des plasmidfreien Rezipientenstamms *E. coli* K12 J53 multipliziert mit 100. Die Fitness des plasmidfreien Transkonjuganten wurde auf 100 % festgelegt.

Die Abweichungen der relativen Fitness der Transkonjuganten zum plasmidfreien Rezipienten bewegten sich im Bereich von ca. -5 % bis +7 % (**Tabelle 27**). Bei den meisten Transkonjuganten lagen die Abweichungen im Bereich von 1 - 2 % (**Abbildung 23**). Isolate mit höherer negativer Abweichung im relativen Wachstum waren 346/12 K2, 102/04 K2 und 151/09 K2. Ein Isolat, 102/04 K1, zeigte

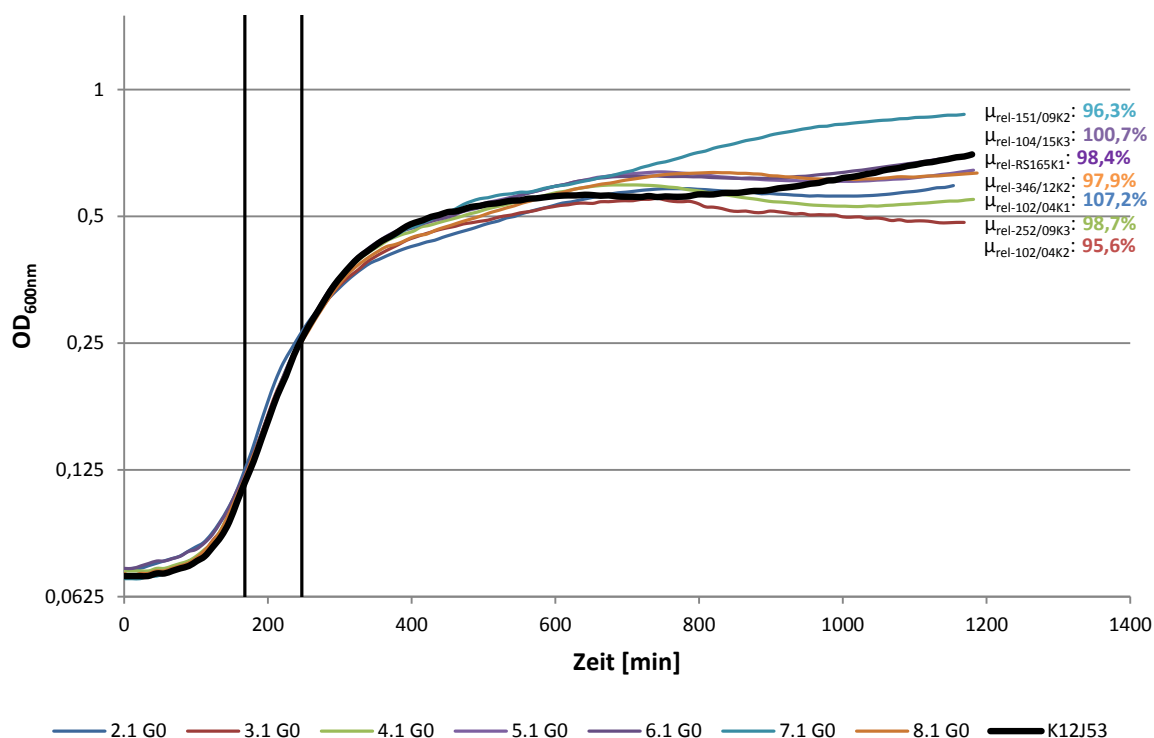
interessanterweise eine höhere Fitness im Vergleich zu *E. coli* K12 J53. Sieben der Transkonjuganten (102/04 K1, 102/04 K2, RS165 K1, 252/09 K3, 346/12 K2, 151/09 K2 und 104/15 K3) wurden für die weiteren Analysen ausgewählt.



**Abbildung 23: Relative Wachstumsraten der Transkonjuganten gegenüber dem plasmidfreien Rezipienten *E. coli* K12 J53.** Die Wachstumsraten wurden im Bioscreen C Photometer (OD-Messung alle 10 min) in LB Medium aufgenommen. Ausgewählte Isolate für weitere Analysen sind blau hinterlegt.

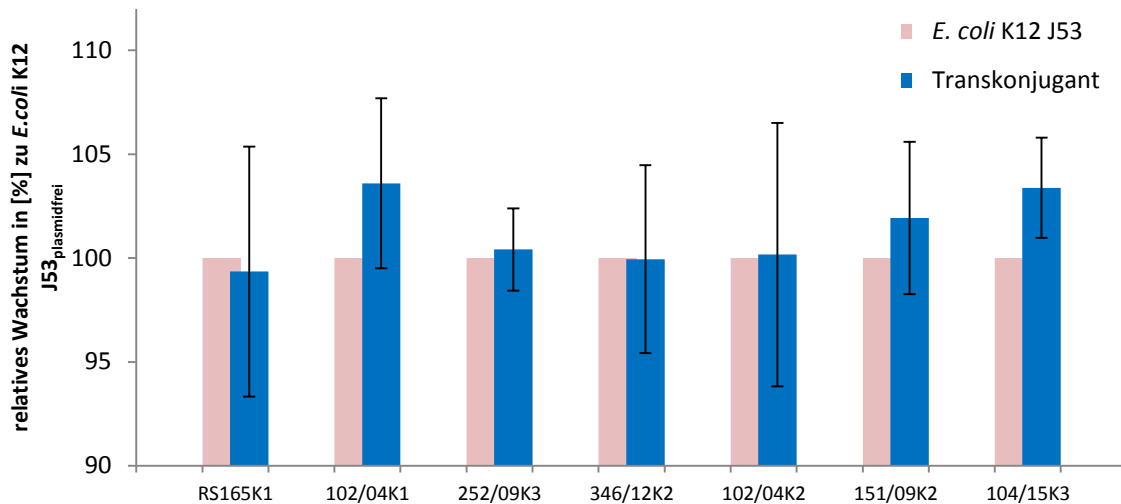
Neben der Wachstumsrate wurden noch weitere Unterschiede im Wachstumsverhalten beobachtet. Außerhalb der exponentiellen Wachstumsphase kam es zu unterschiedlichen Kurvenverläufen in der späten *log*- oder stationären Phase (**Abbildung 24**). Stämme mit den höchsten Wachstumsraten hatten zudem nicht immer die höchste Endpunkt-OD (siehe 102/04 K1). Vereinfacht wurde angenommen, dass bei kontinuierlichem und konkurrierendem Wachstum eine höhere Wachstumsrate zu einem Fitnessvorteil und damit zur höheren Abundanz über die Zeit führen würde. Daher wurde im Folgenden die Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase als Marker für die Fitness der Isolate verwendet.





**Abbildung 24: Kombinierte Wachstumskurven ausgewählter Transkonjuganten im Vergleich zum plasmidfreien Rezipienten *E. coli* K12 J53.** Der Bereich der exponentiellen Wachstumsphase zur Analyse der Wachstumsraten ist durch die schwarzen Balken markiert.

Die Wachstumsraten der sieben ausgewählten Isolate wurden zusätzlich in 10 ml LB-Medium Schüttelkultur untersucht. Aufgrund der viel niedrigeren Probenahmefrequenz (alle 30 min) war hier jedoch keine ausreichend detaillierte Auflösung der exponentiellen Wachstumsphase, wie bei den Bioscreenmessungen (alle 10 min), möglich. Durch die hohe Zelldichte war eine vollständige Homogenisierung der Zellsuspension vor den OD-Messungen nicht möglich. Diese führten vermutlich zu den hohen Abweichungen in der ermittelten relativen Fitness. Ein weiterer Störfaktor war vermutlich, dass es sich, im Gegensatz zur photometrischen Plattenwachstumsmessung, um eine invasive Messung (Kulturentnahme) handelte. Die ermittelten Unterschiede in den Wachstumsraten zwischen plasmidfreien und Plasmid-tragenden isogenen Stämmen konnten anhand dieser Versuchsreihe nicht nachvollzogen werden (**Abbildung 25**).



**Abbildung 25: Relative Wachstumsraten der Transkonjuganten gegenüber dem plasmidfreien Rezipienten *E. coli* K12 J53.** Durchgeführt in LB Medium in 10 ml Schüttelkultur (Probenahme alle 30 min).

### 3.3.3 Transferexperimente

Ziel der Studie war es, mögliche Kompensationseffekte einer initialen Fitnesslast zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Langzeitkultivierungen der ausgewählten Transkonjuganten durchgeführt. Die sieben Transkonjuganten, sowie der plasmidfreie *E. coli* K12 J53 Referenzstamm, wurden für 500 Generationen durch täglichen Transfer der Bakteriensuspension in frisches LB-Medium, kultiviert.

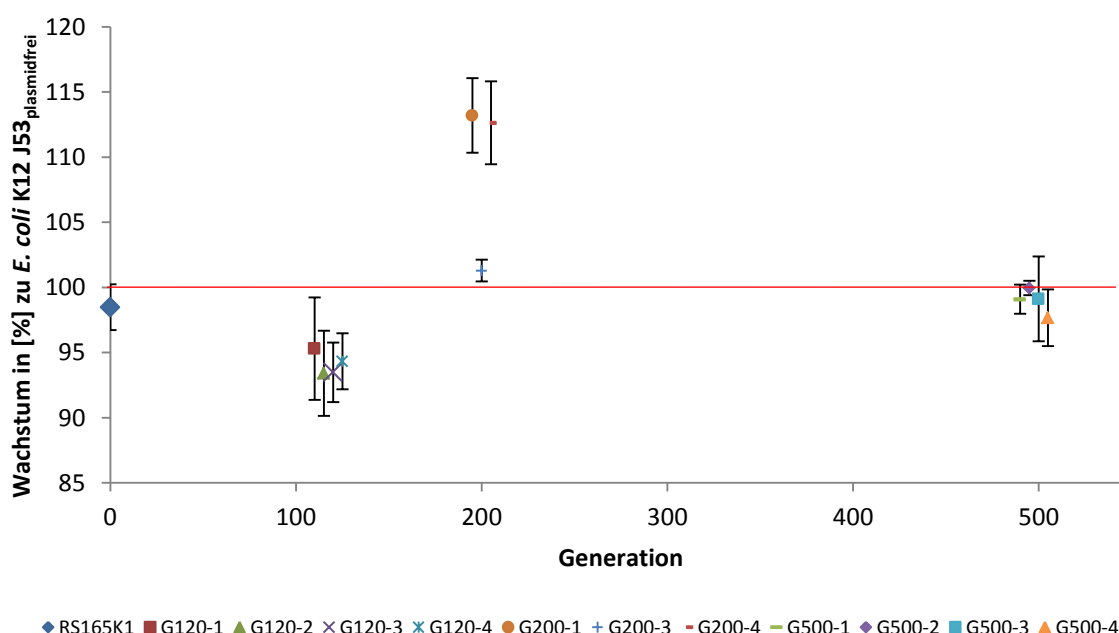
Zunächst wurde die Anzahl der Generationen pro Überimpfung ermittelt. Da in nur 5 ml LB-Bouillon kultiviert wurde, war der Verdünnungsfaktor für den Generationenzuwachs limitierend. Ein Verdünnungsfaktor von 500 ergab einen Zuwachs von 8,96 Generationen ( $\log_2 500$ ) pro Überimpfung. Um Generationen  $G_{500}$  zu erreichen, wurden die Kulturen der Transkonjuganten daher für 56 Tage konsekutiv überimpft.

Die Langzeitkulturen wurden zu ausgewählten Zeitpunkten ( $G_{120}$ ,  $G_{200}$  und  $G_{500}$ ) auf Änderungen ihrer relativen Fitness getestet. Die Isolate der Generationen  $G_{200}$  und  $G_{500}$  wurden zusätzlich auf Anwesenheit des Resistenzplasmids und Änderungen in ihrer antimikrobiellen Empfindlichkeit untersucht. Die Änderungen der Fitnesslast wurden durch Wachstumsvergleiche gegen den plasmidfreien Rezipienten und gegen Transkonjuganten der Generation  $G_0$  ermittelt.

Innerhalb der Langzeitkulturen wurde von einer Populationsdiversität ausgegangen. Von den ausplattierten Langzeitkulturen wurden daher jeweils 4 Kolonien ausgewählt und analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen für Isolate mit vorliegenden Sequenzdaten (RS165 K1, 102/04 K1 und 102/04 K2) detailliert dargestellt. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche aller Isolate sind in **Tabelle 27** einsehbar. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitsmessungen sind in **Tabelle A-6** aufgeführt.

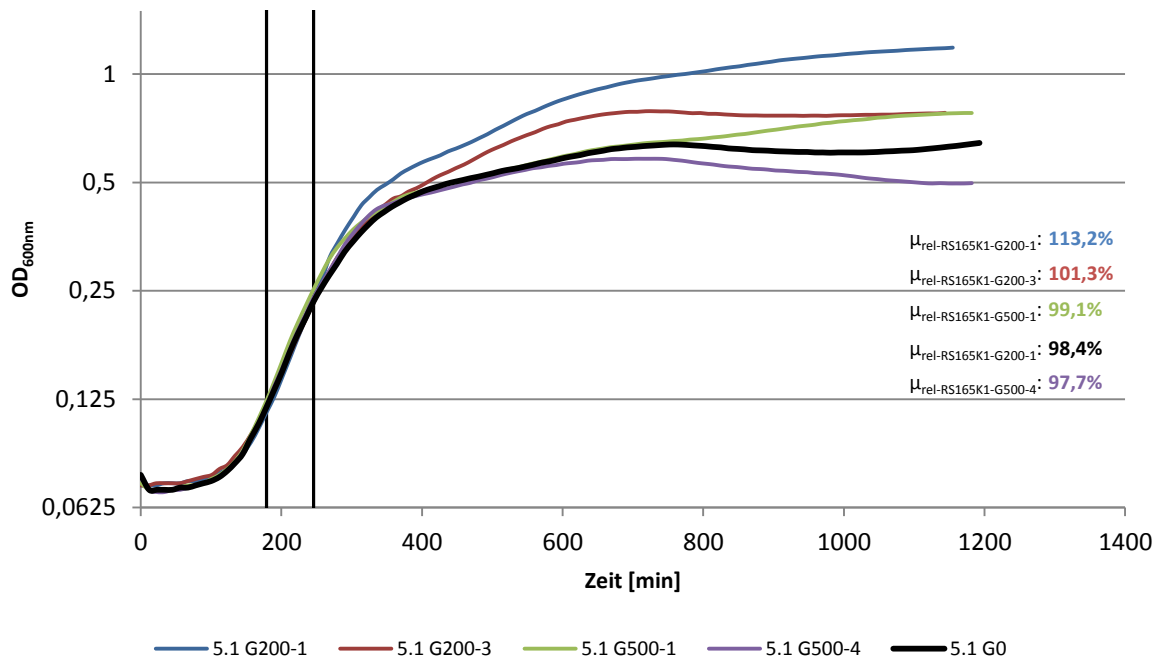
### 3.3.3.1 RS165 K1

Die Transkonjugante RS165 K1 trug ein 70 kb großes, die  $\beta$ -Laktamasen CTX-M-14 und TEM-1 kodierendes IncFII Plasmid. Initial zeigte RS165 K1 eine relative Fitnesslast (98,47 %) im Vergleich zum plasmidfreien Rezipientenstamm. Die Änderungen der relativen Fitness von langzeitkultivierten Transkonjuganten über die Generationen  $G_{120}$ ,  $G_{200}$  und  $G_{500}$  sind in **Abbildung 26** dargestellt. Die Isolate der verschiedenen Generationen zeigten untereinander unterschiedliche Fitnesseffekte. Die ausgewählten Kolonien von  $G_{120}$  wiesen eine noch stärkere Fitnesslast im Vergleich zu  $G_0$  auf, während bei zwei Kolonien von  $G_{200}$  ein hoher Fitnesszuwachs im Vergleich zu  $G_0$  zu beobachten war. Dieser Fitnessgewinn konnte bei Isolaten der Generation  $G_{500}$  jedoch nicht mehr beobachtet werden. Vielmehr wurde in allen  $G_{500}$  Isolat eine relative Fitness vergleichbar mit  $G_0$  und dem plasmidfreien *E. coli* K12 J53 nachgewiesen.



**Abbildung 26:** Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von RS165 K1

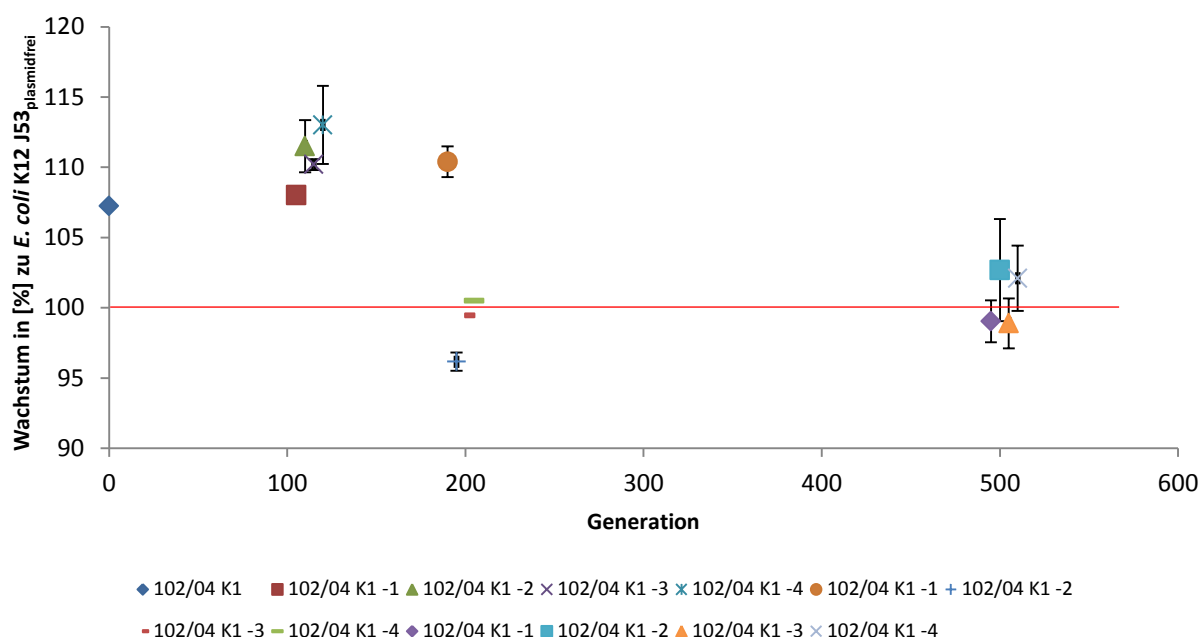
Neben den unterschiedlichen Fitnesswerten der Isolate, wurden zusätzlich Abweichungen im Wachstumsverhalten außerhalb der exponentiellen Phase beobachtet (**Abbildung 27**). Unterschiede zeigten sich insbesondere in der beobachteten End-OD<sub>600nm</sub> nach 20 h. Anders als die verschiedenen  $G_0$  Transkonjuganten (**Abschnitt 3.3.2**), korrelierte eine hohe End-OD mit einer höheren Fitness.



**Abbildung 27: Überlagerte Wachstumskurven ausgewählter RS165 K1 Transkonjuganten verschiedener Generationen.** Die Isolate zeigen unterschiedliches Wachstumsverhalten. Dargestellt sind die Transkonjuganten RS165 K1 G<sub>0</sub>, RS165 K1 G<sub>200</sub>-1, RS165 K1 G<sub>200</sub>-3, RS165 K1 G<sub>500</sub>-1, RS165 K1 G<sub>500</sub>-4. Der Bereich der exponentiellen Wachstumsphase ist durch die schwarzen Balken markiert.

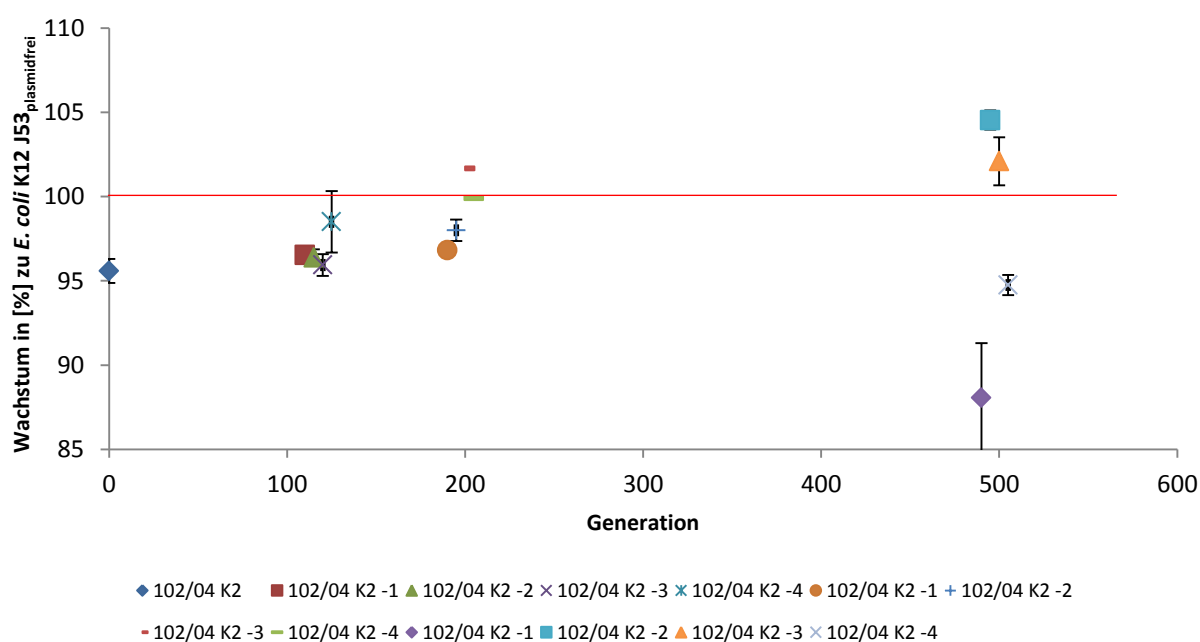
### 3.3.3.2 102/04 K1 und 102/04 K2

Die Transkonjuganten 102/04 K1 und 102/04 K2 wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt. Ausgangsmaterial in beiden Fällen war das Wildtyp Isolat 102/04 und der Rezipientenstamm *E. coli* K12 J53. In beiden Fällen wurde ein *bla*<sub>CMY-16</sub> und *bla*<sub>TEM-1</sub> tragendes, 160 kb großes IncA/C Plasmid in den Rezipientenstamm transferiert. Bemerkenswerter Unterschied zwischen diesen beiden Transkonjuganten war ihr unterschiedliches Verhalten in den Wachstumsmessungen. 102/04 K1 zeigte einen Zugewinn in der relativen Fitness gegenüber *E. coli* K12 J53<sub>plasmidfrei</sub> (**Abbildung 28**), währenddessen 102/04 K2 einen relativen Fitnessverlust aufwies (**Abbildung 29**). Während der Langzeitkultivierung wurden in frühen Generationen (G<sub>120</sub>) „fittere“ Isolate als in der initialen Generation G<sub>0</sub> beobachtet. Im weiteren Verlauf der Langzeitkultivierung nahm jedoch die relative Fitness der untersuchten Isolate ab. Bei Generation G<sub>500</sub> wurden Isolate mit vergleichbarer Fitness zum plasmidfreien Rezipienten nachgewiesen. Isolate der Generation G<sub>200</sub> (102/04 K1-2/3) zeigten sogar geringere Wachstumsraten als der Vergleichsstamm.



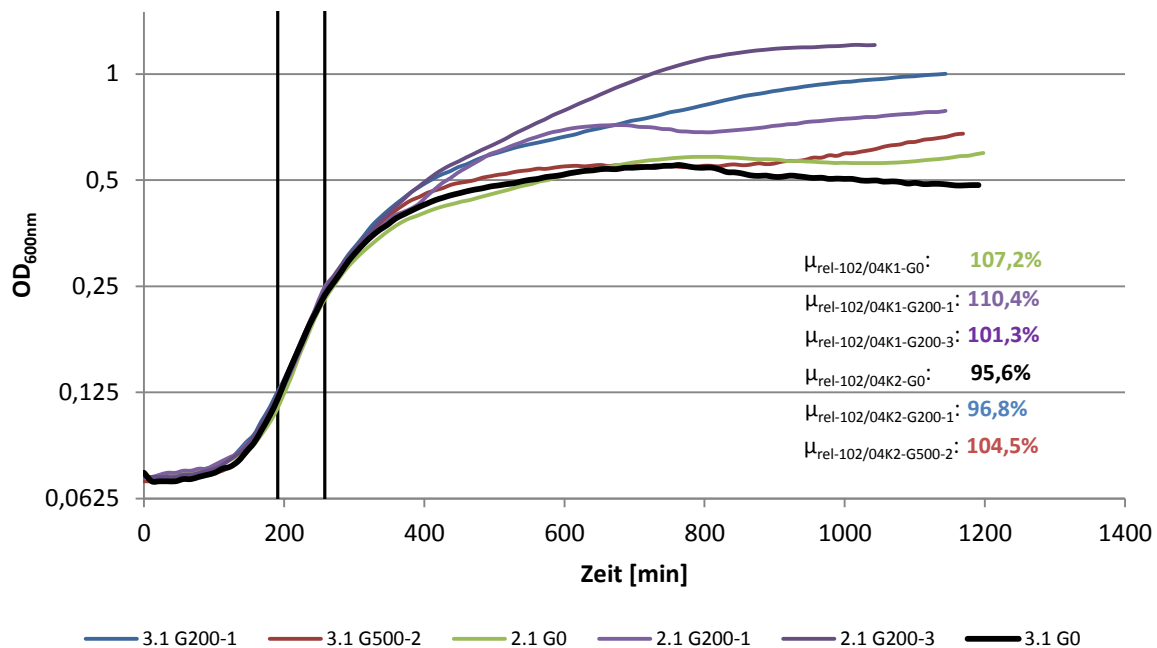
**Abbildung 28:** Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von 102/04 K1

Im Gegenteil dazu steht die beobachtete Entwicklung der relativen Fitness von 102/04 K2. Über die Generationen  $G_{120}$  und  $G_{200}$  zeigte sich bei den untersuchten Isolat ein Trend zu zunehmender Fitnesslastkompensation (**Abbildung 29**). Bei Generation  $G_{500}$  wurden Isolate verschiedenster Fitness nachgewiesen. Zwei Isolate zeigten sich als „fitter“ als der plasmidfreie Rezipientenstamm wohingegen die zwei weiteren Isolate eine geringere Fitness als initial bei  $G_0$  gemessen zeigten.



**Abbildung 29:** Relative Fitness zufällig ausgewählter Kolonien verschiedener Generationen nach Langzeitkultivierung von 102/04 K2

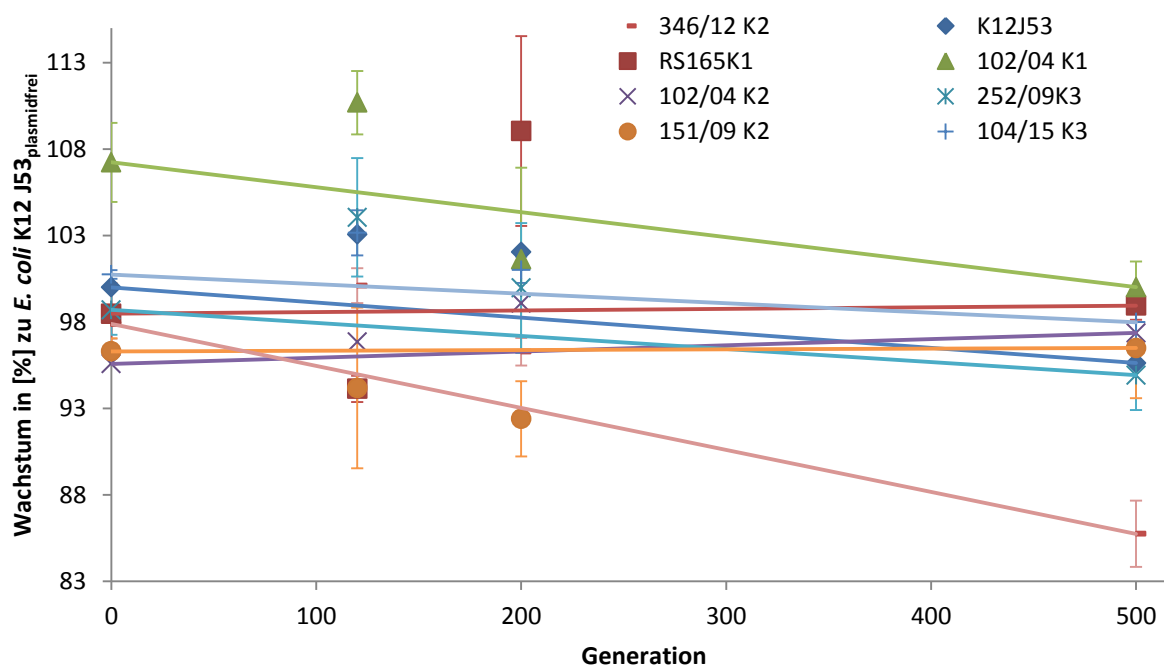
Die Transkonjuganten 102/04 K1 und K2 verschiedener Generationen zeigten zusätzlich unterschiedliches Wachstumsverhalten außerhalb der exponentiellen Phase (**Abbildung 30**). Im Unterschied zu RS165 K1 korrelierten die End-OD Werte nach 20 h nicht mit der relativen Fitness: Isolat 102/04 K2 G<sub>200</sub>-1 zeigte beispielsweise trotz geringerer Fitness als 102/04 K2G<sub>500</sub>-2 eine höhere End-OD.



**Abbildung 30: Überlagerte Wachstumskurven ausgewählter 102/04 K1 und K2 Transkonjuganten verschiedener Generationen.** Die Isolate zeigen unterschiedliches Wachstumsverhalten. Dargestellt sind die Transkonjuganten 102/04 K1 G<sub>0</sub>, G<sub>200</sub>-1 und G<sub>200</sub>-3, sowie 102/04 K2 G<sub>0</sub>, G<sub>200</sub>-1 und G<sub>500</sub>-2. Der Bereich der exponentiellen Wachstumsphase ist durch die schwarzen Balken markiert.

### 3.3.3.3 Fitnesstrend und weitere Beobachtungen

**Abbildung 31** zeigt den Fitnesstrend aller Isolate. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Fitness der einzelnen Klone. Bis auf Transkonjuganten der Linie RS165 K1 zeigten alle langzeitkultivierten Transkonjuganten und auch der plasmidfreie *E. coli* K12 J53 Stamm einen gleichbleibenden oder abnehmenden Trend in relativer Fitness über 500 Generationen im Vergleich zu Generation  $G_0$ . Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass bei  $G_{120}$  in den meisten Fällen eine höhere relative Fitness als bei  $G_0$  ermittelt wurde.



**Abbildung 31:** Fitnesstrend der einzelnen Transkonjuganten über 500 Generationen.

Neben den Wachstumsraten wurden die passagierten Transkonjuganten regelmäßig auf antimikrobielle Empfindlichkeit des transferierten Resistenzgens getestet, sowie die Anwesenheit des  $\beta$ -Laktamasegens überprüft. Bei allen ausgewählten langzeitkultivierten Transkonjuganten wurde das  $\beta$ -Laktamasegen per PCR nachgewiesen. Eine Änderung der jeweiligen, durch das Plasmid-vermittelten antimikrobiellen Empfindlichkeiten, wurde nicht beobachtet.

**Tabelle 27: Fitnesswerte der langzeitkultivierten Transkonjuganten.** Die relative Fitness der initial hergestellten Transkonjuganten ist unter Generation  $G_0$  angegeben. Die Anzahl der Wiederholungen und die Standardabweichungen der Fitness sind zu den jeweiligen Wachstumsversuchen angegeben.

Isolat	Generation $G_0$ relative Fitness [%] Mittelwert (n Versuche)		Generation $G_{120}$ relative Fitness [%] Mittelwert (n Versuche)		Generation $G_{200}$ relative Fitness [%] Mittelwert (n Versuche)		Generation $G_{500}$ relative Fitness [%] Mittelwert (n Versuche)	
	StandAb		StandAb		StandAb		StandAb	
<b>K12J53</b>	100							
<b>K12J53-1</b>			100,93 (1)		102,03 (2)	0,36	96,87 (3)	1,86
<b>K12J53-2</b>			104,05 (1)		101,31 (2)	0,31	93,54 (3)	1,31
<b>K12J53-3</b>			105,45 (1)		low growth (2)		94,68 (3)	1,78
<b>K12J53-4</b>			101,84 (1)		102,81 (2)	2,77	97,41 (3)	2,20
<b>RS165K1</b>	98,47 (8)	1,76						
<b>RS165 K1-1</b>			95,30 (2)	3,93	113,19 (2)	2,85	99,08 (3)	1,12
<b>RS165 K1-2</b>			93,41 (2)	3,26	low growth (2)		99,95 (3)	0,55
<b>RS165 K1-3</b>			93,48 (2)	2,29	101,29 (2)	0,83	99,11 (3)	3,25
<b>RS165 K1-4</b>			94,33 (2)	2,14	112,63 (2)	3,18	97,66 (3)	2,18
<b>102/04 K1</b>	107,23 (4)	2,29						
<b>102/04 K1-1</b>			108,00 (2)	0,14	110,38 (2)	1,09	99,04 (3)	1,49
<b>102/04 K1-2</b>			111,51 (2)	1,85	96,16 (2)	0,65	102,68 (3)	3,63
<b>102/04 K1-3</b>			110,20 (2)	0,39	99,46 (1)		98,89 (3)	1,78
<b>102/04 K1-4</b>			113,01 (2)	2,78	100,49 (1)		102,10 (3)	2,33
<b>102/04 K2</b>	95,58 (3)	0,71						
<b>102/04 K2-1</b>			96,53 (2)	0,23	96,81 (2)	0,19	88,07 (3)	3,24
<b>102/04 K2-2</b>			96,38 (2)	0,49	97,99 (2)	0,64	104,53 (3)	0,57
<b>102/04 K2-3</b>			95,93 (2)	0,64	101,66 (1)		102,09 (3)	1,42
<b>102/04 K2-4</b>			98,50 (2)	1,83	99,89 (1)		94,75 (3)	0,60
<b>252/09K3</b>	98,70 (3)	1,45						
<b>252/09 K3-1</b>			100,44 (2)	0,04	101,68 (1)		92,69 (3)	1,07
<b>252/09 K3-2</b>			104,05 (2)	0,59	101,39 (1)		95,65 (3)	2,12
<b>252/09 K3-3</b>			109,55 (2)	1,26	103,23 (1)		93,49 (3)	0,35
<b>252/09 K3-4</b>			102,14 (2)	0,23	93,57 (1)		97,86 (3)	2,02
<b>151/09 K2</b>	96,30 (3)	0,76						
<b>151/09 K2-1</b>			97,68 (2)	2,06	89,81 (1)		100,37 (3)	1,42
<b>151/09 K2-2</b>			86,30 (2)	5,08	93,74 (1)		97,60 (3)	0,58
<b>151/09 K2-3</b>			97,47 (2)	3,59	95,21 (1)		92,42 (3)	0,65
<b>151/09 K2-4</b>			95,27 (2)	1,64	90,82 (1)		95,59 (3)	1,36
<b>104/15 K3</b>	100,74 (3)	0,25						
<b>104/15 K3-1</b>			105,08 (2)	1,63	102,09 (2)	1,21	99,16 (3)	1,46
<b>104/15 K3-2</b>			103,58 (2)	2,82	101,26 (2)	1,51	97,99 (3)	1,40
<b>104/15 K3-3</b>			102,16 (2)	0,72	100,01 (2)	1,80	99,58 (3)	2,38
<b>104/15 K3-4</b>			101,78 (2)	0,19	100,70 (2)	1,81	95,20 (3)	1,93
<b>346/12 K2</b>	97,88 (3)	0,84						
<b>346/12 K2-1</b>			101,06 (2)	0,08	96,17 (1)		87,19 (3)	1,70
<b>346/12 K2-2</b>			101,06 (2)	0,88	97,60 (1)		83,70 (3)	0,60
<b>346/12 K2-3</b>			98,70 (2)	1,09	95,86 (1)		84,05 (2)	1,36
<b>346/12 K2-4</b>			99,58 (2)	1,92	95,50 (1)		88,07 (3)	1,40



### 3.3.4 Genomvergleiche

#### 3.3.4.1 *De novo* Sequenzierung ausgewählter Transkonjuganten

Nach 500 Generationen Langzeitkultivierung wurden drei Transkonjugantenlinien (RS165 K1, 102/04 K1 und 102/04 K2) für Ganzgenomuntersuchungen ausgewählt. Generation  $G_0$  Isolate der Transkonjuganten 102/04 K1 und 102/04 K2 wurden mittels PacBio-Technologie (*Single Molecule Sequencing*) zur Erstellung einer Referenzsequenz sequenziert. Zusätzlich wurden jeweils die Isolate von Generation  $G_0$  zu Sequenzkorrekturzwecken, sowie 102/04 K1  $G_{500}$  und Isolate verschiedener Generationen von RS165 K1 mittels Illumina MiSeq sequenziert (**Tabelle 28**). Mit Hilfe der Ganzgenomsequenzen konnten die Isolate auf mögliche Basensubstitutionen, Deletionen, Insertionen oder Modifikationen anderer Art im Chromosom oder Plasmid untersucht werden. Identifizierte Sequenzmodifikationen wurden auf einen möglichen Einfluss auf die Fitness der Isolate untersucht.

**Tabelle 28: Isolate mit durchgeführter Ganzgenomsequenzierung und eingesetzte Technologie**

Stamm	$G_0$	$G_{200}-1$	$G_{200}-3$	$G_{500}-3$	$G_{500}-1$
102/14K1	Illumina MiSeq PacBio				Illumina MiSeq
102/04K2	Illumina MiSeq PacBio				
RS165K1	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	

Die Assemblierung der PacBio-Reads ergab für die Isolate 102/04 K1 und K2 jeweils zwei Contigs, wobei je ein Contig das Chromosom und das Plasmid vollständig abdeckten. Mit Hilfe der Illumina-Reads wurden diese PacBio-Contigs korrigiert und Chromosom und Plasmid ringgeschlossen. Die Contigs wurden durch den RAST Annotationsserver annotiert (159). Die chromosomalen Sequenzen der beiden Isolate waren nahezu identisch und unterschieden sich nur anhand einiger Insertionsstellen von MGEs. Die Charakteristika der Nukleotidsequenzen der Isolate sind in **Tabelle 29** ersichtlich.

**Tabelle 29: Ergebnisse der *de novo*-Sequenzierung und Assemblierung der Reads der Isolate 102/04 K1 und K2 $G_0$ .** Zusätzlich sind die Mappingergebnisse der Reads von 102/04 K1  $G_{500}-1$  aufgeführt.

	102/04K1	p102/04K1	102/04K2	p102/04K2	102/04K1 $G_{500}-1$	p102/04K1 $G_{500}-1$
<b>Größe</b>	4.687.587	164.040	4.685.473	164.040	4.690.582	165.381
<b>GC-Gehalt</b>	50,8 %	52,3 %	50,8 %	52,3 %	50,8 %	52,8 %
<b>CDS</b>	4.495	206	4.493	206	4.498	207
<b>rRNA</b>	22	-	22	-	22	-
<b>tRNA</b>	86	-	86	-	86	-
<b>Mean Coverage (Illumina Reads)</b>	49,4	40,6	32,7	24,6	81,9	120,1

Für die Rekonstruktion der RS165 K1 Chromosomsequenzen wurde die korrigierte PacBio Sequenz von 102/04 K1 als Mappingreferenz eingesetzt. Die Plasmidsequenz von pRS165 K1 wurde anhand einer *de novo* Assemblierung rekonstruiert. Die Sequenziertiefe der sequenzierten Isolate sind in **Tabelle 30** aufgeführt.

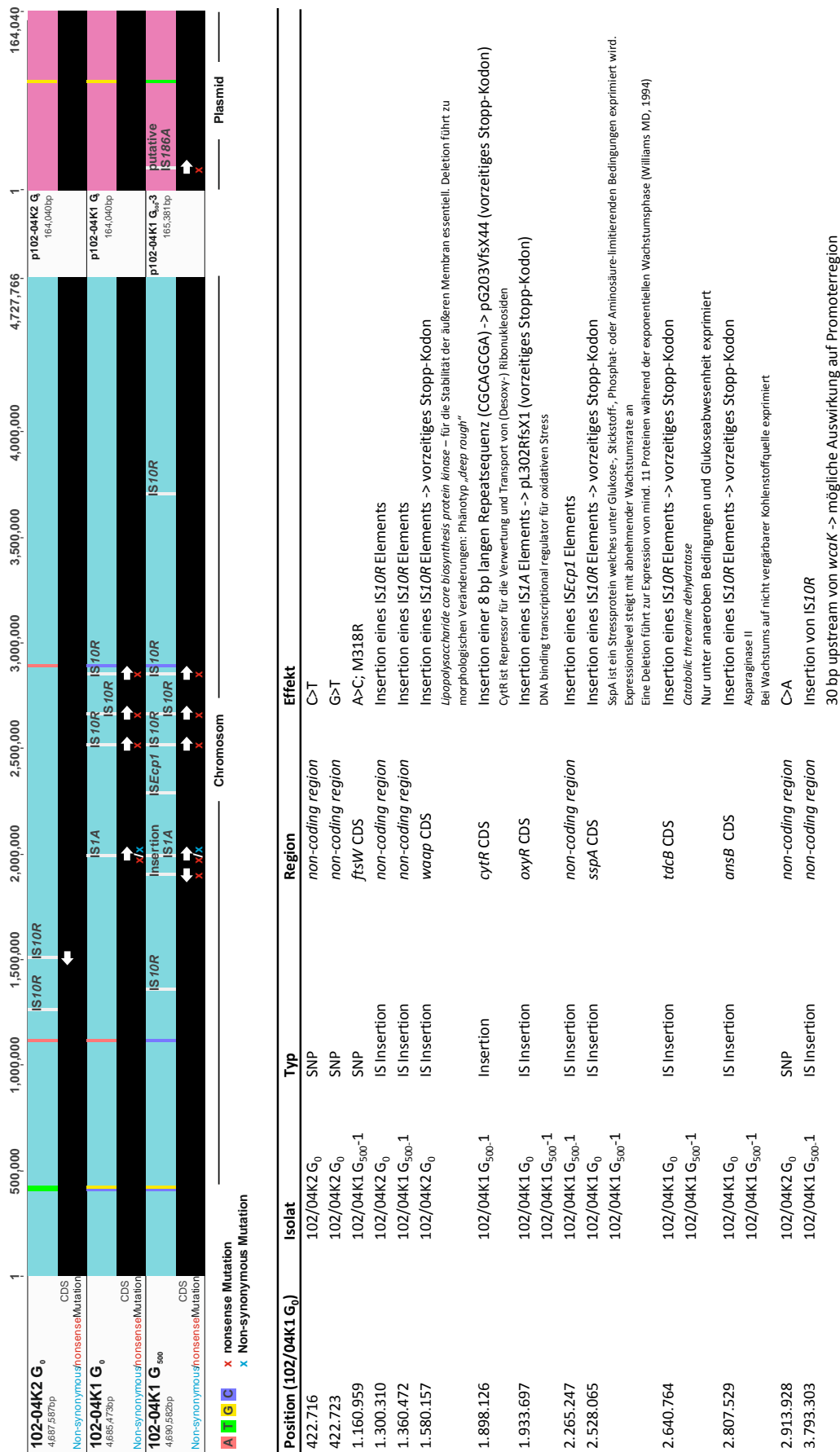
**Tabelle 30: Ergebnisse des Mappings der Reads der verschiedenen RS165K1 Isolate auf die Referenzsequenz 102/04 K1 G<sub>0</sub>.** Zusätzlich sind die Ergebnisse der *de novo* Assemblierung der pRS165 K1 Plasmidsequenzen aufgeführt.

	RS165K1 G <sub>0</sub>	pRS165K1 G <sub>0</sub>	RS165K1 G <sub>200-1</sub>	pRS165K1 G <sub>200-1</sub>	RS165K1 G <sub>200-3</sub>	pRS165K1 G <sub>200-3</sub>	RS165K1 G <sub>500-3</sub>	pRS165K1 G <sub>500-3</sub>
<b>Größe</b>	4.682.662	70.269	4.686.841	70.269	4.687.417	70.269	4.688.104	70.269
<b>GC-Gehalt</b>	50,8 %	52,3 %	50,8 %	52,3 %	50,8 %	52,3 %	50,8 %	52,3 %
<b>CDS</b>	4.508	96	4.511	96	4.512	96	4.512	96
<b>rRNA</b>	22	-	22	-	22	-	22	-
<b>tRNA</b>	86	-	86	-	86	-	86	-
<b>Mean Coverage</b>	41,7	165,8	79,7	240,4	82,6	274,3	85,9	320,4

### 3.3.4.2 Ganzgenomvergleiche der Transkonjuganten

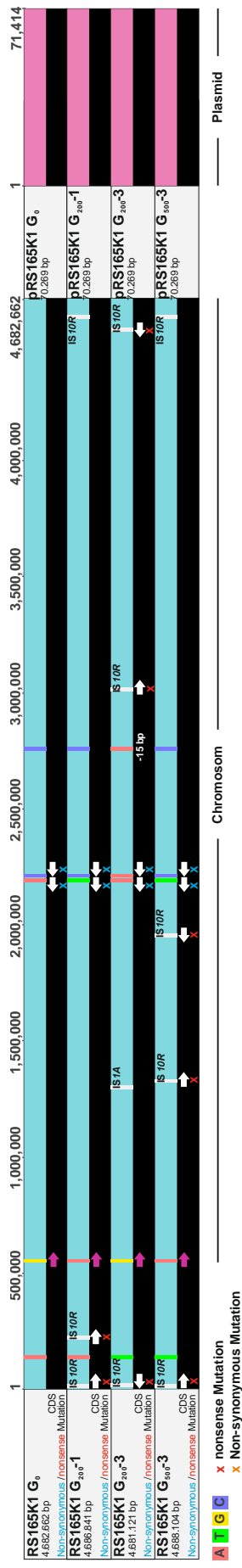
Die rekonstruierten Genom- und Plasmidsequenzen der Isolate der verschiedenen Generationen von RS165 K1, sowie die drei 102/04 Transkonjuganten wurden bioinformatisch auf Sequenzunterschiede untersucht. Zunächst wurden die Ganzgenomsequenzen mittels *MAUVE* Algorithmus aligniert. Die einzelnen Sequenzunterschiede wurden im Anschluss im Detail betrachtet. Abgesehen von wenigen SNPs und Insertionssequenzen waren die Genom- und Plasmidsequenzen der verschiedenen Transkonjuganten 102/04 K1 und K2, sowie RS165 K1 zueinander homolog und zeigten keine Restrukturierungen oder Neuorganisationen.

Zwischen allen 102/04 Isolaten wurden insgesamt vier chromosomale und ein plasmidischer SNP ermittelt. Zusätzlich zeigten sich elf unterschiedliche Insertionsstellen (zehn auf dem Chromosom und eine auf der Plasmidsequenz). Von diesen Änderungen der Nukleotidsequenz lagen acht in nicht kodierenden Regionen. Ein SNP verursachte eine *non-synonymous* Mutation einer Proteinsequenz und sieben Insertionssequenzen führten zu *nonsense* Mutationen der kodierten Aminosäuresequenz durch vorzeitige Stoppkodons. Detaillierte Informationen über die einzelnen Nukleotidsequenzänderungen sind in **Abbildung 32** aufgelistet. Die meisten SNPs und Insertionsstellen wurden dabei zwischen den Isolaten 102/04 K1 und K2 beobachtet, die Isolate 102/04K1 G<sub>0</sub> und G<sub>500</sub> waren häufig in ihren SNPs und Insertionsstellen identisch (**Abbildung 32**). Aber auch zwischen diesen Folgeisolaten wurden sieben SNPs oder durch Insertionen verursachte Unterschiede beobachtet. Auffällig war, dass die inserierten IS Elemente in nahezu allen Fällen dem Element *IS10R* angehörten.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen der Transkonjuganten 102/04 K1 und K2 nach Langzeitkultivierung.** Mutationen im Chromosom und mögliche Auswirkung sind mit jeweiliger Position gelistet. Basensubstitutionen sind farblich schematisch markiert. Die Positionen von abweichenden IS-Elementen sind durch weiße Balken hervorgehoben. Weiße Pfeile weisen auf Veränderungen in kodierenden Sequenzen hin.

Im Vergleich zu den Beobachtungen bei den 102/04 K1 und K2 Isolaten wurden zwischen den verschiedenen RS165 K1 Isolaten 14 Veränderungen in der chromosomalen Nukleotidsequenz nachgewiesen. Die Plasmidnukleotidsequenzen wiesen keine Unterschiede zueinander auf. Bei den Veränderungen handelte es sich um fünf SNPs, von denen zwei SNPs in nicht kodierenden Regionen lagen und zwei weitere SNPs zu *non-synonymous* Mutationen führten. Der verbleibende SNP lag an Position 3 (Akzeptorarm) der *tRNA<sup>Gln</sup> (glnV)* bei Isolat RS165K1 G<sub>200</sub>-1. Weiterhin wurden neun IS-Element Insertionen beobachtet, von denen sieben IS-Elemente in kodierenden Sequenzen lokalisiert waren und zu *nonsense* Mutationen führten. Informationen über die einzelnen Nukleotidsequenzänderungen sind in **Abbildung 33** gelistet. Isolate der Generation G<sub>200</sub> zeigten untereinander unterschiedliche Mutationen. In Generation G<sub>500</sub> konnten identische Veränderungen wie in G<sub>200</sub> nachgewiesen werden (**Abbildung 33**). Wie schon bei 102/04 K1/2 machte den Großteil der Unterschiede in den Nukleotidsequenzen die Insertion von *IS10R* an verschiedenen Positionen im Chromosom aus.



Position (102/04K1 G <sub>0</sub> )	Isolat	Typ	Region	Effekt
9.892	RS165K1 G <sub>200</sub> -1	IS Insertion	<i>ycgF</i>	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon <i>blue light response regulator</i>
25.459	RS165K1 G <sub>500</sub> -3	IS Insertion	<i>lit</i> CDS	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon E14 prophage cell death peptidase
128.694	RS165K1 G <sub>200</sub> -3	SNP	<i>non-coding region</i>	A>T
183.882	RS165K1 G <sub>500</sub> -3	IS Insertion	<i>wzc</i> CDS	Insertion eines IS10R Elements Protein-Tyrosin Kinase – für Kolonialsynthese benötigt
578.258	RS165K1 G <sub>200</sub> -1	SNP	<i>glnV tRNA<sup>Gln</sup></i>	3G>A Substitution liegt im Akzeptorarm
1.360.451	RS165K1 G <sub>500</sub> -3	IS Insertion	<i>non-coding region</i>	Insertion eines IS10R Elements
1.366.599	RS165K1 G <sub>500</sub> -3	IS Insertion	<i>yihS</i> CDS	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon Sulfoquinovose Isomerase
1.898.141	RS165K1 G <sub>500</sub> -3	IS Insertion	<i>cyrR</i> CDS	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon CyrR ist Repressor für die Verwertung und Transport von (Desoxy-) Ribonukleosiden
2.240.818	RS165K1 G <sub>200</sub> -1	SNP	<i>treB</i> CDS	pV113E <i>Trehalose-specific PTS enzyme II BC component</i>
2.285.253	RS165K1 G <sub>200</sub> -3	SNP	<i>rhsA</i> CDS	pG242W Rekombination Hotspot?
2.761.093	RS165K1 G <sub>200</sub> -3	SNP	<i>non-coding region</i>	C>A In -15 Region einer Domäne unbekannter Funktion
3.041.422	RS165K1 G <sub>200</sub> -3	IS Insertion	<i>nlpD</i> CDS	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon Mureinhydrolase Aktivator – Phentyp deutet auf mögliche äußere Membrandefekte hin
4.541.413	RS165K1 G <sub>200</sub> -3	IS Insertion	putative CDS	Insertion eines IS10R Elements -> vorzeitiges Stopp-Kodon Putative Sucrose Phosphorylase
4.642.024	RS165K1 G <sub>200</sub> -1	IS Insertion	<i>non-coding region</i>	Insertion eines IS10R Elements
	RS165K1 G <sub>500</sub> -3			

**Abbildung 33: Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen der Transkonjugante RS165 K1 nach Langzeitkultivierung.** Mutationen im Chromosom und mögliche Auswirkung sind mit jeweiliger Position gelistet. Basensubstitutionen sind farblich schematisch markiert. Die Positionen von abweichenden IS-Elementen sind durch weiße Balken hervorgehoben. Weiße Pfeile weisen auf Veränderungen in kodierenden Sequenzen hin.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 „ESBL *E. coli* Populationsstudie“ - Populationsuntersuchung von ESBL *E. coli* aus der Limbach-Laborverbund Studie, der Studie „Allgemeinbevölkerung“ und Fall-Kontroll Studie (Charité)

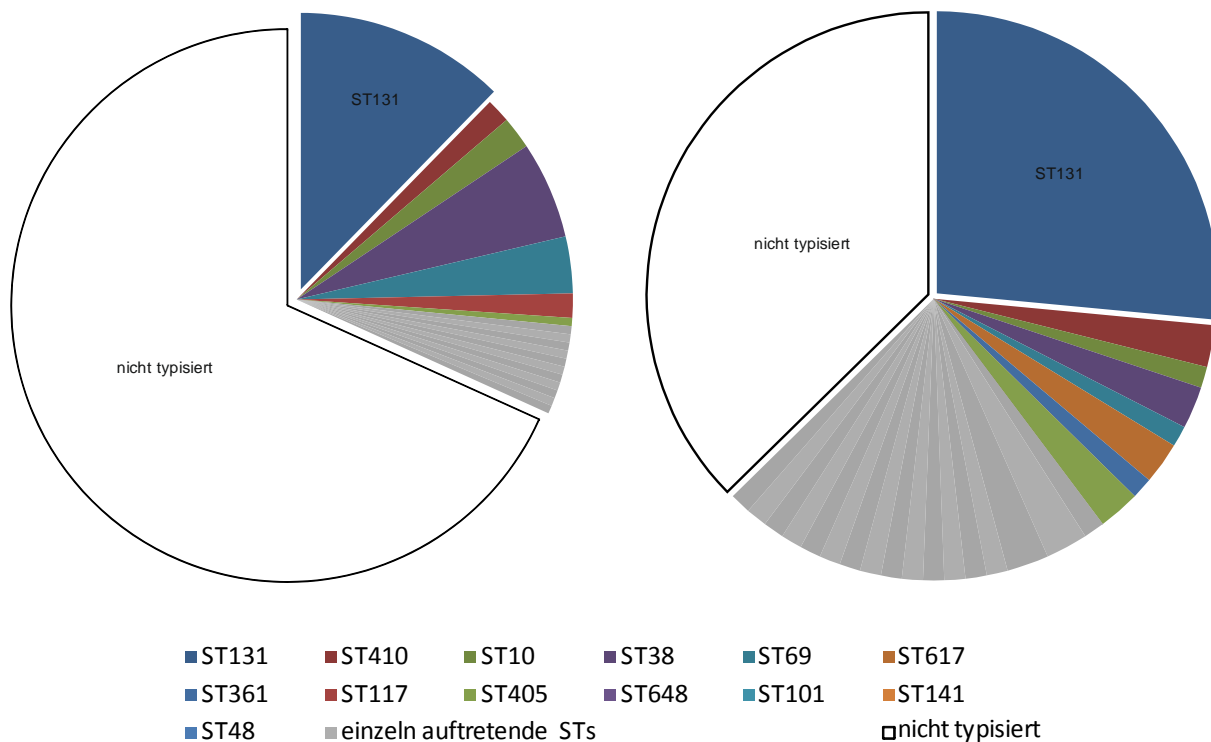
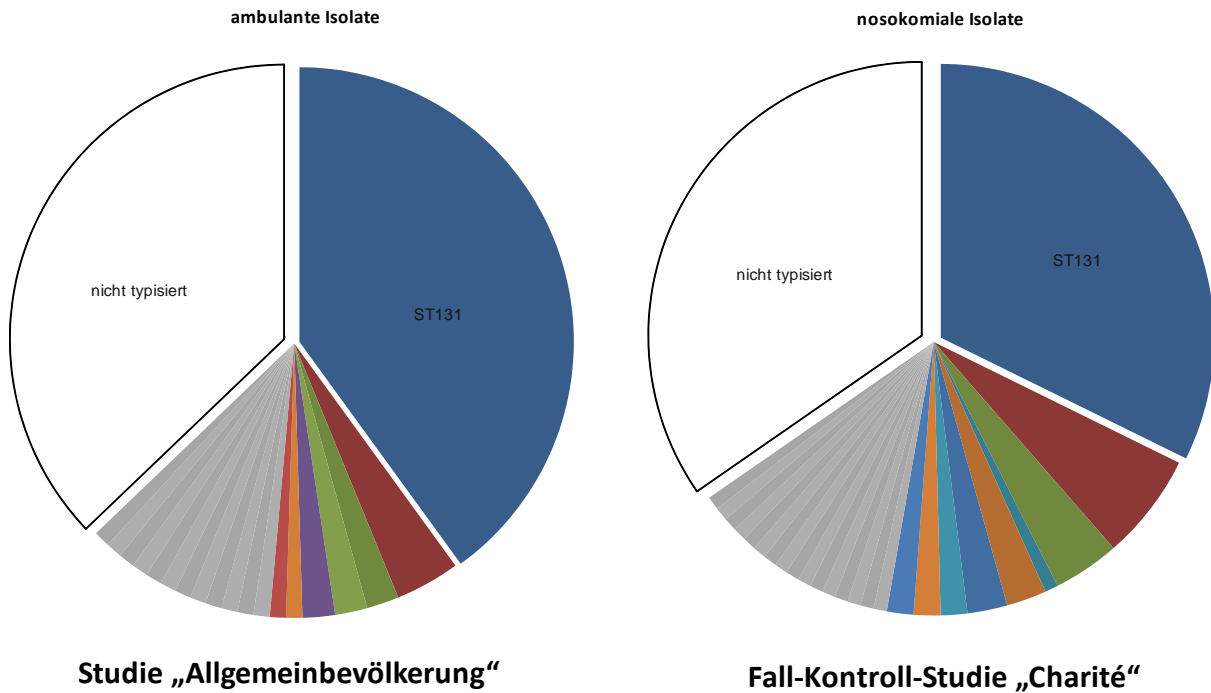
Drei, im Rahmen des RESET Projekts durchgeführte Studien befassten sich mit der Charakterisierung von ESBL-produzierenden *E. coli*. In der ersten kooperativen Studie des RKI mit dem Limbach-Laborverbund, lag der Fokus auf ESBL-Bildnern aus dem ambulanten Bereich (n=105) sowie Krankenhäusern (n=126). Bei der zweiten Studie handelte es sich um eine Fall-Kontroll-Studie, bei der die Risikofaktoren für den Erwerb einer ambulanten Kolonisation mit ESBL-bildenden *E. coli* untersucht wurden (139). In der dritten Studie wurden die ESBL-Besiedlungsraten bei gesunden Probanden aus der Allgemeinbevölkerung erfasst (11). Die Genotypisierung der ESBL-Gene, sowie die Einordnung in phylogenetische Gruppen der Isolate vom Limbach-Laborverbund und der Fall-Kontroll-Studie wurde in der Dissertation von Herrn Christoph Eller thematisiert (138). Die Charakterisierung der Isolate aus der Allgemeinbevölkerung wurde am LGL in Erlangen durchgeführt (11). In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine Auswahl an Isolaten (n=268) aus den drei Studien Multilokus-sequenztypisiert um eine detaillierte Übersicht der Populationsstruktur von ESBL-produzierenden *E. coli* in Deutschland zu erhalten.

In allen drei Studien wurde eine hohe Diversität an Sequenztypen beobachtet, insgesamt wurden 61 verschiedene Sequenztypen identifiziert (**Abbildung 34** und **Tabelle 14**). Neben der hohen Populationsdiversität wurden allerdings einige Sequenztypen häufiger in allen Studienpopulationen nachgewiesen; dies betrifft ST131, ST410, ST10 und ST38, deren Vorkommen nachfolgend diskutiert wird. Diese Beobachtung spiegelt die hohe Diversität von *E. coli* wieder, welche immer wieder in verschiedensten Populationsuntersuchungen an ESBL-bildenden *E. coli* weltweit beobachtet wurde (81, 189, 190).

#### 4.1.1 ST131

*E. coli*-ST131 ist eine weltweit häufige klonale Linie und wird in der Literatur auch einfach nur als „clone ST131“ bezeichnet. ST131 spielt bei der weltweiten Verbreitung von ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> eine wichtige Rolle (33). Kennzeichen von ST131-isolaten ist die Zugehörigkeit zur phylogenetischen Gruppe B2; deren Anteil in den drei zuvor beschriebenen Studien zu ESBL-*E. coli* (**Abschnitt 3.1** und **Tabelle 14**) sehr hoch war (138). Mittels einer ST131-spezifischen PCR (140) wurden in dieser Studie 32,3 % der nosokomialen und 40 % der ambulanten ESBL-*E. coli* des Limbach-Laborverbundes dem Sequenztyp ST131 zugeordnet.

### Studie Laborverbund Limbach



**Abbildung 34: Verteilung der Sequenztypen bei ESBL-bildenden *E. coli* aus verschiedenen Studien.**

Der Anteil von *E. coli*- ST131 ist je für die gesamte Studienpopulation mittels PCR (Blanco *et al.* 2009) ermittelt worden.

Der leicht höhere Anteil an ST131 im ambulanten Bereich ist durch eine höhere Anzahl an Isolaten aus Harnwegsinfektionen im Vergleich zu den nosokomialen Isolaten bedingt; internationale Studien bestätigen, dass *E. coli* bei ambulanten Harnwegsinfektionen besonders häufig vorkommt (33, 138). In



der „Fall-Kontroll-Studie“, deren Isolate aus dem Aufnahmescreening von Patienten stammten, war der ST131-Anteil mit 26 % etwas geringer; den niedrigsten Anteil mit 12,3 % zeigte das rektale Screening gesunder Probanden in Bayern. Die in dieser Studie nachgewiesenen Anteile von ST131 bei ESBL-bildenden *E. coli* lagen aus ambulanten und nosokomialen Umfeld im vergleichbaren Bereich zum europäischen Raum (191). Vergleichbare Daten zum Anteil von ST131 bei ESBL-bildenden *E. coli* im Verdauungstrakt in der Allgemeinbevölkerung oder von nicht-erkrankten Probanden existieren nur vereinzelt. Die Prävalenz der fäkalen ESBL-produzierenden *E. coli* ST131-Isolate bei gesunden Probanden scheint dabei, abhängig von der Bevölkerung und dem Studienjahr, erheblich zu variieren (95). Aus China und Frankreich wurden ST131-Prävalenzen von 7 % (2009) bzw. 14 % (2011) in der gesunden Allgemeinbevölkerung berichtet; in Australien (2009 - 2011) lag der ST131-Anteil bei 1 % bei gesunden Kindern (192-194). Viel höhere ST131-Anteile bei ESBL-*E. coli* wurden dagegen in Rehabilitationszentren (40 %) und Altersheimen in Deutschland (44 %, Zeitraum 2010 - 2011) und Großbritannien (98 %, Zeitraum 2005 - 2006) beobachtet (195-197). Im Nutz- und Haustierbereich liegen nur sporadische Berichte zum Auftreten von ST131 bei ESBL-bildenden *E. coli* vor (81). Der Anteil an ST131 bei Haustieren ist vermutlich durch einen Mensch-zu-Tier-Transfer bedingt. Insgesamt deutet die Datenlage auf ein humanes statt tierisches Reservoir von ST131 hin, was unter anderem durch die Ergebnisse einer breit angelegten Studie in Großbritannien, den Niederlanden und Deutschland bestätigt wurde (198).

Da die ST131-Typisierung zunächst PCR-basiert nach Blanco *et al.* durchgeführt wurde, ergaben sich Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der MLST und der *rfbO25b* Methodik. Die Diskrepanz kam dadurch zu Stande, dass die *rfbO25b*-PCR ST131 Isolate vom Serotyp O16 nicht erfasst. Eine nachträglich durchgeführte *rfbO16*-PCR der abweichenden Isolate erfasste diese als ST131 zugehörig.

Da die *rfbO16*-PCR nicht bei allen Isolaten eingesetzt wurde, kann vermutet werden, dass der Anteil an ST131 möglicherweise etwas höher liegt.

Wie in **Abschnitt 1.3.2.1** erklärt, teilt sich die Populationsstruktur von *E. coli*-ST131 in mehrere Subkladen auf (95). Die Klade H30Rx (oder C2), welche mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und Fluorchinolonresistenz assoziiert ist, wird unter anderem durch das *fimH30* Allel und Mutationen in der DNA-Gyrase (*gyrA*) und Topoisomerase IV (*parC*) definiert. Da ein großer Teil der ST131 Isolate aus nosokomiale (87,8 %) und ambulante (90,5 %) Hintergrund gegenüber Fluorchinolonen resistent war, kann vermutet werden, dass der Großteil dieser Isolate in die besonders erfolgreiche Klade H30Rx fällt. Bis auf zwei Isolate war eine direkte Zuordnung zur Klade H30Rx jedoch nicht möglich. Dies lag wahrscheinlich an der geringen Anzahl sequenzierter ST131 Isolate mit CTX-M-15 (zwei Isolate). Diese Diskrepanz ist durch die Auswahl der Isolate für die Ganzgenomsequenzierung bedingt. Hier wurde der Fokus auf Isolate mit übereinstimmenden Charakteristika zwischen Mensch, Tier und Lebensmittel gelegt. Da CTX-M-15 eine eher untergeordnete Rolle bei Isolaten von Tier und Lebensmittel spielt, wurden dementsprechend

wenige Isolate Ganzgenom-sequenziert (125). Nichtsdestotrotz konnten die sequenzierten ST131-*E. coli* der jeweiligen ST131 Klade zugeordnet werden (**Tabelle 15**).

Anhand einer Virulenzfaktorprofil-Typisierung stellten von Johnson *et al.* fest, dass *E. coli* der phylogenetischen Gruppen B2 und D häufiger mit Virulenzfaktoren assoziieren und Verursacher von Harnwegsinfektionen sind als *E. coli* Stämme aus den phylogenetischen Gruppen A und B1 (146). Eine Analyse der Virulenzprofile von ST131 und Nicht-ST131 Stämmen zeigte zudem, dass ST131-*E. coli* aus verschiedenen geografischen Regionen höhere Virulenzscores (Anzahl verschiedener Virulenzmarker/ST) und zudem ein signifikantes Set an Genen als Nicht-ST131 Stämme trugen (199).

Die erfolgreiche Anpassung und Besiedlung an das humane Blasenmilieu sind womöglich auf die spezifischen Virulenzfaktoren von ST131 zurückzuführen (95, 96, 98).

#### 4.1.2 ST410, ST10, ST38 und ST69

Die Sequenztypen ST410, ST10, ST38 und ST69 wurden in den Isolaten der drei Studien häufiger gefunden (**Tabelle 14**); ihr exakter Anteil kann jedoch, im Gegensatz zu ST131, nicht angegeben werden, da nicht alle Studienisolate sequenziert wurden und keine spezifische PCR für diese Sequenztypen verfügbar ist. Das vermehrte Auftreten in dieser zufällig selektierten Studienpopulation deutet jedoch darauf hin, dass diese Sequenztypen im Vergleich zur allgemein hohen Sequenztyp-Diversität eine höhere Prävalenz zeigen könnten. Die im Rahmen der drei Studien gefundenen Isolate vom ST410 (n=17), gliedern sich in die phylogenetische Gruppe A ein und assoziieren mit dem ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. In einer Studie von Schaufler *et al.*, sowie einer weiterführenden Studie im Rahmen des RESET-Projektes von Falgenhauer *et al.* wurde das Auftreten von *E. coli*-ST410 mit chromosomal lokalisiertem *bla*<sub>CTX-M-15</sub> im humanen und veterinären Bereich, sowie aus Umweltproben in Deutschland berichtet (124, 125). Die hohe genetische Verwandtschaft der ST410 Isolate dieser Studien deutet auf eine klonale Verbreitung von *E. coli*-ST410 hin. Zudem impliziert der Nachweis von genetisch eng verwandten ST410 Isolaten aus verschiedensten Habitaten, dass ST410 über ein breites Wirtsspektrum verfügt (124). Ein zeitgleicher Transfer von Resistenzgenen, wie z.B. *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, zwischen verschiedenen Habitaten erscheint anhand dieser Beobachtungen nachvollziehbar (125). Datenbankeinträge von *E. coli*-ST410 auf der Plattform EnteroBase bestätigen ein weltweites Vorkommen (Afrika, Asien, Europa, Nord- und Südamerika mit 388 Einträgen, Abfrage Februar 2018). In einer brasilianischen Studie mit 25 klinischen Proben wurde *E. coli*-ST410 mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub> sogar als häufigster Sequenztyp nachgewiesen (200). Ob es sich bei ST410 um eine weitere weltweit erfolgreiche klonale Linie vergleichbar zu *E. coli*-ST131 oder regional unterschiedliche Linien handelt bleibt abzuwarten und wird durch zukünftige Surveillance Studien beantwortet werden müssen.

Neben ST410 wurde ST10 in höherer Anzahl (n=12) nachgewiesen. ST10 bildet einen genetisch sehr heterogenen, weit verbreiteten Sequenztyp von *E. coli*, und gehört der phylogenetischen Gruppe A, zu der, im Gegensatz zur Gruppe B2, häufig kommensale *E. coli* gehören (102, 201). ST10 wird anhand des Warwick MLST Schemas nur unzureichend aufgelöst. In höher auflösenden Analysemethoden (z.B. cgMLST) präsentiert sich die ST10-Populationsstruktur als höchst divers (siehe **Abbildung A-4**) (80). *E. coli*-ST10 wurde weltweit nachgewiesen und wurde in zahlreichen Studien aus Europa, Amerika und Asien als ESBL-Bildner beim Menschen beschrieben worden (81, 202, 203). Berichte von Gastrointestinal- oder Urogenitaltraktinfektionen bei Schweinen und Rindern in Deutschland und den Niederlanden deuten zudem auf eine breite Wirtsadaptation hin (204, 205). Die Heterogenität der Isolationsquellen, die sich in den Ästen des *Minimum-Spanning Tree* (**Abbildung A-4**) zeigt, unterstützt diese Vermutung. Bemerkenswert hoch war der Anteil von *bla*<sub>CTX-M-1</sub> bei den hier identifizierten ST10 Isolaten (10/12). CTX-M-1 wird im Allgemeinen häufiger bei *E. coli* von Schwein, Rindern und Geflügel als bei *E. coli* vom Mensch detektiert (119, 206). Über die Lage des *bla*<sub>CTX-M-1</sub> Gens auf möglicherweise ähnlichen Plasmiden oder gar im *E. coli*-ST10 Chromosom, ist bisher nichts bekannt.

Auffällig war die Anzahl der ESBL-bildenden *E. coli*-ST38 (n=12) und *E. coli*-ST69 (n=7) Isolate in der gesunden Probanden (Studie Allgemeinbevölkerung), sowie die Abwesenheit dieser STs in den anderen beiden Studien. ST38 gruppiert in die phylogenetische Gruppe D, die allgemein mit extraintestinalen und pathogenen (ExPEC) Stämmen assoziiert (72). Auffällig war, dass die vorliegenden *E. coli*-ST38 Isolate ausschließlich das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> trugen. ESBL-bildende *E. coli*-ST38 wurden bisher im humanmedizinischen Bereich eher selten gefunden; der Nachweis von ST38 in Studien aus China, Japan, Frankreich, Ägypten und Kanada bestätigt aber eine weltweite Verbreitung dieses ST im humanen Bereich (207-212). In der Veterinärmedizin wurde ST38 als ESBL-Bildner bei Geflügel und Wildvögeln bestätigt (213-215). Allgemein zeigten diese Untersuchungen, dass ESBL-bildende *E. coli*-ST38, (wie auch in unserer Studie), zumeist *bla*<sub>CTX-M-14</sub> tragen, vermehrt beobachtet wurde außerdem eine Tendenz zur chromosomalen Integration von ESBL, AmpC und Carbapenemase Genen (210, 211, 214).

Wie auch ST38 gehört ST69 der phylogenetischen Gruppe D an. Auch dieser ST wurde in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich als rektaler Besiedlungskeim gesunder Probanden nachgewiesen (**Tabelle 14**). Seit seiner Erstbeschreibung 1999 wurde dieser ST in gesunden Probanden, Krankenhauspatienten aber auch Haustier-, Nutztier-, Wildtier- und Lebensmittelisolaten weltweit nachgewiesen (81, 216). ST69 wurde als häufiger Verursacher von *community acquired* Harnwegsinfektionen nachgewiesen und als auch in Nutztieren oder kommerziellen Fleischprodukten gefunden (207). So war die klonale Linie ST69 beispielsweise über einen Zeitraum von 4 Monaten verantwortlich für 11 % aller *E. coli* Harnwegsinfektionen und 51 % aller Trimethoprim/Sulfamethoxazol-resistenten *E. coli* Harnwegsinfektionen in einer kalifornischen Gemeinde (207, 217).

#### **4.1.3 Fazit**

Die hier durchgeführte PCR- und MLST-basierte Populations-Untersuchung der ESBL-bildenden *E. coli* vom Mensch, darunter Krankenhauspatienten, ambulante Patienten und gesunde Probanden, bestätigte die Präsenz der dominanten, human-spezifischen *E. coli*-ST131 Linie, welche weltweit verbreitet ist. Zudem zeigte die MLST-Analyse ein gehäuftes Vorkommen von weiteren STs, wie ST410, ST10, ST38 und ST69, die zuvor auch schon bei Tieren und Lebensmitteln nachgewiesen wurden. Die hohe Ähnlichkeit von ST410 Isolaten von Tier und Mensch, wurde in weiterführenden Ganzgenomanalysen unter Berücksichtigung der vorliegenden Studienisolate nachgewiesen. Für ST10, ST38 und ST69 kann ein Austausch zwischen Mensch und Tier, entsprechend der vorliegenden Daten, vermutet werden; detaillierte Ganzgenom-berücksichtigende Analysen von Isolaten aus den verschiedenen Populationen (Mensch, Tier, Lebensmittel) sind erforderlich, um mögliche Transmissionswege genauer zu beleuchten.

## 4.2 CMY-2 Studie

### 4.2.1 Untersuchung der Populationsstruktur von *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden *E. coli*

Seit Beginn des neuen Jahrtausends ist das Vorkommen von Enterobacteriaceae, insbesondere *E. coli*, mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in der Humanmedizin weltweit stark angestiegen (218). Im gleichen Zeitraum nahm der Einsatz von Cephalosporinen in der Nutztierhaltung zu, was steigende Nachweiszahlen von Cephalosporin-resistenten Enterobacteriaceae zur Folge hatte (81, 219, 220). Insbesondere bei landwirtschaftlichen Nutztieren und auf rohem Fleisch wurden *E. coli* mit Resistenzen gegen Cephalosporine der 3. Generation nachgewiesen. Carmo *et al.* wiesen 2014 darauf hin, dass sich die Verteilung der ESBL/AmpC Genotypen je nach geografischer Herkunft und abhängig vom Reservoir unterschieden (Mensch, Tier, Tierprodukt, Umwelt) (120). Bei Geflügel und Geflügelfleisch dominieren insbesondere die ESBL/AmpC Varianten *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CMY-2</sub>, während im humanen Bereich *bla*<sub>CMY-2</sub> bei nur ca. 1 % der 3. Generation Cephalosporin-resistenten *E. coli* für den Resistenzmechanismus verantwortlich ist (11, 221). Die Betriebsprävalenzen von bis zu 100 % an 3. Generation Cephalosporin resistenten *E. coli* und der Nachweis von bis zu 30 % positiv getesteten Geflügel- und bis zu 100 % Geflügelfleischisolaten geben Anlass zur Sorge, dass es zu möglichen Transmissionen resistenter Erreger vom veterinären in den humanen Bereich kommt (81, 113, 141, 215, 219). Von einigen ESBL-produzierenden klonalen *E. coli* Linien, wie z.B. dem CTX-M-15-produzierenden *E. coli*-ST410, ist die Zirkulation in verschiedenen Reservoiren (Patienten, gesunde Allgemeinbevölkerung, Nutztiere, Haustiere und Wasserproben) bereits bekannt (124, 125). Transmissionsstudien zu CMY-2-produzierenden *E. coli* wurden bisher jedoch nur in Norwegen, Dänemark und den Niederlanden durchgeführt (126, 186, 222). Im Rahmen dieser Studie wurden daher, in Zusammenarbeit mit Kooperationspartner von BfR, FLI und FU, die Genome von 164 *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden *E. coli* Isolaten von Fleischprodukt (n=63), Nutztier (n=55) und Patienten aus Klinik und Ambulanz (n=46) untersucht. Ziel war es anhand der Genomdaten Aussagen über die Verbreitung der verschiedenen CMY-2 produzierenden *E. coli* und der Resistenzgen-tragenden mobilen genetische Elemente zu treffen und entsprechende Transmissionen von *bla*<sub>CMY-2</sub> zwischen den Reservoir im nationalen oder internationalen Bereich abzuschätzen zu können.

Mit Hilfe der Multilokus-Sequenztypisierung wurde zunächst die Populationsstruktur der Studienisolate bestimmt. Die 164 Isolate teilten sich auf 59 verschiedene Sequenztypen auf. Auffällig war, dass Isolate vom Mensch eine größere Diversität der Sequenztypen zeigten als Isolate von Nutztier und Lebensmittel (**Tabelle 16**). Trotz dieser hohen Diversität wurden einige STs häufiger identifiziert: ST38 (n=19), ST131 (n=14), ST117 (n=14), and ST69 (n=8). Diese STs sind bei ESBL-bildenden *E. coli* von Lebensmittel, Nutztier und Patienten ebenso bekannt und deuten auf eine, vom Resistenzgen unabhängige, erfolgreiche Verbreitung dieser klonalen Linien hin (81, 207). Die Aufspaltung der Populationsstruktur

von *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden *E. coli* in viele verschiedene ST, bei gleichzeitig wenigen dominanten ST, deckt sich mit den Studien aus dem europäischen Raum (Norwegen, Dänemark, Schweiz, Niederlande). Ähnlich zur vorliegenden Studie wurden vor allem Isolate vom Sequenztyp ST38, ST117, ST131 und ST69 in höherer Anzahl nachgewiesen (126, 182, 186, 222). Interessanterweise wurden relativ viele ST131 Isolate (12,2 %) bei CMY-2-bildenden *E. coli* vom Nutztier gefunden. Dies stellt einen Gegensatz zu ESBL-bildenden *E. coli* dar, bei denen ST131 in Isolaten von (Nutz-)Tieren in der Regel selten (< 1%) vertreten ist (81). Die Rate der humanen ST131 Isolate ist dagegen geringer als bei ESBL-Bildnern in Deutschland (Allgemeinbevölkerung: 12,3 % - Krankenhauspatienten: 32,3 % - Ambulante Patienten: 40,0 %) (105). Die weiteren häufig identifizierten Sequenztypen ST38 und ST117 wurden in der vorliegenden Studie fast ausschließlich bei Geflügelisolaten identifiziert und sind gleichermaßen seltene ESBL-Bildner beim Menschen (105).

Der Sequenztyp kann in Kombination mit weiteren phylogenetischen und genetischen Markern, wie z.B. Resistenzgen und Plasmidtyp, sowie dem Resistenzphänotyp, erster Anhaltspunkt für eine mögliche klonale Verbreitung sein und erste Einblicke in die Populationsstruktur geben. Detaillierte Rückschlüsse über Transmissionen zwischen verschiedenen Reservoiren, bzw. entlang der Lebensmittelkette können aber anhand von Typisierungsmethoden mit niedrigem Auflösungsvermögen, wie z.B. der MLST, nicht getroffen werden (126). Um diese Fragestellung weiter zu verfolgen, wurde daher eine höherauflösende Analyseverfahren, die cgMLST, eingesetzt. Erwartungsgemäß deckte sich der Aufbau der Populationsstruktur der cgMLST mit der MLST (**Abbildung 12**). Mehrgewinn der cgMLST war jedoch die detailliertere Auflösung der STs in Subkladen. Die Isolate eines Sequenztyps zeigten dabei unterschiedlich ausgeprägte genetische Distanzen untereinander. Beispiel für einen niedrigen Verwandtschaftsgrad bei Isolaten eines Sequenztyps ist ST10. Die Heterogenität in der cgMLST Analyse ist jedoch durch die ST10 zu Grunde liegenden Allele im gewählten MLST Schema (Wirth *et al.*) bedingt (77). Anhand anderer existierender *E. coli* MLST Schemata (Pasteur Schema und Michigan Schema) würde sich hierbei eine differenziertere Einteilung der Isolate in verschiedene STs ergeben (77-80). Zwischen Isolaten eines Sequenztyps zeigten Isolate vom Mensch in der Regel eine größere Differenz zu Isolaten von Nutztier und Lebensmittel. Sporadische, klonale Transmissionen zwischen den Reservoirs mit anschließender paralleler und unabhängiger Mikroevolution innerhalb eines Reservoirs könnte diese Beobachtung von identischen STs mit verschiedenen genetischen Verwandtschaftsmerkmalen erklären (81).

Sehr geringe Sequenzunterschiede zwischen Isolaten von Mensch, Nutztier und Lebensmittel wurden nur in zwei Fällen, bei ST131 und ST1463, beobachtet. Die beobachteten SNPs zwischen den ST131-Isolaten 468-16 und 399-15 (27 SNPs), sowie den ST1463-Isolaten 1036-14 und RL274 (21 SNPs) liegen, bei einer abgeschätzten Mutationsrate von *E. coli* von  $2,3 \times 10^{-7}$  bis  $3,0 \times 10^{-6}$  Nukleotidsubstitutionen

pro Base pro Jahr, in einer Größenordnung (2,3 - 31,2 SNPs/2 Jahre), welche bei einer zeitlichen Differenz von zwei Jahren zwischen den Isolationszeitpunkten möglich wären (126, 223, 224). Ein gemeinsamer Vorfahr und eine klonale Transmission der Isolate entlang der Lebensmittelkette in jüngerer Vergangenheit könnte hier die Ursache für die hohe genetische Übereinstimmung der Isolate sein. Vergleichbare, auf Transmissionereignisse deutende Beobachtungen wurden in Norwegen bei nahezu identischen *E. coli*-ST38 Isolaten (SNP-Differenzen von 1 - 13) von Hühnern und Krankenhauspatienten gemacht (222).

Neben den zwei Fällen genetisch eng verwandter Isolate von Mensch und Nutztier/Lebensmittel wurden bei ST117, ST3887 und ST429 Isolaten von Geflügel und Geflügelfleisch geringe Sequenzunterschiede identifiziert. Die nachfolgende SNP-basierte Analyse zeigte, dass vor allem bei ST117 und ST3778 Isolaten Sequenzunterschiede von nur 0 - 20 SNPs vorlagen, die auf eine direkte genetische Verwandtschaft der Isolate hinweisen. Die Anzahl an SNPs der ST117 und ST3778 Isolate ist gleich oder nur unwesentlich größer als die Anzahl an SNPs welche bei *E. coli* mit epidemiologischem Zusammenhang nachgewiesen wurden (126, 225). Bei genetisch eng verwandten Isolaten aus Ausbruchssituationen lag die Anzahl der SNPs beispielsweise bei  $\leq 6$  (klonale *E. coli* des EHEC Ausbruchs in Deutschland 2011),  $\leq 4$  (epidemiologisch verwandte Isolate von *E. coli* O157 aus Schottland) oder  $\leq 23$  (*E. coli* O157 Ausbruch in Alberta, Kanada) (224-226).

Einen weiteren Anhaltspunkt für die klonale Transmission von *bla*<sub>CMY-2</sub> ergab die Analyse der ST429 Isolate. Die cgMLST Analyse zeigte die Studienisolate und Isolate aus dem europäischen Ausland in einer Klade gruppiert (**Abbildung 22**). Diese Klade umfasste Geflügel- und Geflügelfleischisolate aus Dänemark, Deutschland und Frankreich. Eine zusätzliche Analyse der bei EnteroBase hinterlegten Genomdaten, durchgeführt anhand des EnteroBase eigenen cgMLST Schemas, deckte weitere eng miteinander verwandte Isolate aus Luxemburg und Dänemark auf (**Abbildung A-5**). Für eine cgMLST-basierte Untersuchung (*E. coli ad hoc* cgMLST Schema, basierend auf 2 325 Allelen) von *E. coli* aus nosokomialer Quelle gaben Mellmann *et al.* einen Schwellenwert von  $< 11$  Allelen Differenz zur Identifizierung nosokomialer Transmissionen an (87). Wie in **Abbildung 22** ersichtlich, zeigte ein Großteil der Genomsequenzen Alleldifferenzen unterhalb dieses Schwellenwertes. Auch wenn ein solcher Wert ohne die zugehörigen epidemiologischen Daten nur mit Vorsicht auf einen anderen Bereich, in diesem Fall die Isolate aus Nutztierproduktion, übertragen werden können, so lassen die erhaltenen Daten die Vermutung zu, dass es eine enge genetische Verknüpfung dieser Isolate aus Deutschland, Dänemark und Frankreich gibt, und klonale Transmission bei der Verbreitung von ST429 Isolaten mit *bla*<sub>CMY-2</sub> eine wichtige Rolle spielen. Die Anwesenheit einer identischen IncK2-Plasmidvariante bei allen *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Genomsequenzen dieser ST429-Isolate unterstützt die Vermutung einer klonalen, grenzübergreifenden Verbreitung entlang der Geflügelproduktionskette. Studien aus anderen

europäischen Ländern untermauern diese Vermutung. So wurde die Verbreitung von ESBL-produzierenden *E. coli* Klonen und Plasmiden in importierten Herden in der dänischen Geflügelproduktion, trotz Verabreichungsverbot von Cephalosporinen bei Geflügel, nachgewiesen (215). Eine ähnliche Beobachtung wurde in der norwegischen Geflügelproduktion gemacht, wo eine stabile Kolonisation mit CMY-2 produzierenden *E. coli* vom Muttertier bis hin zum Fleischprodukt auftrat (187). Kreuzkontaminationen durch unzureichende Stallhygiene und Reinigung von Ställen und Schlachthöfen, sowie Eintrag von resistenten Stämmen durch importierte Tiere begünstigen die Ausbreitung distinkter Klone (227).

#### 4.2.1.1 ST131

Ein substanzieller Anteil der Studienisolate gehörte dem ST131 (Human 6/46, 13,0 %; Geflügel 6/45, 13,3 %; Geflügelfleisch 2/63, 3,2 %) an. Bei ESBL-produzierenden *E. coli* ist ST131 der am häufigsten identifizierte Sequenztyp von Isolaten aus dem humanem Bereich (95, 105) (siehe auch **Abschnitt 4.1.1**). Dagegen tritt ST131 bei Nutztier, Haustier oder Wildtieren nur sporadisch auf (0 - 1,8 % der 3. Generation Cephalosporin-resistenten *E. coli*) (81). Der hohe Anteil an ST131 bei Geflügelisolaten ist überraschend aber, da ein Einfluss der Isolatauswahl auf den ST131-Anteil aber ausgeschlossen werden kann, vermutlich biologisch bedingt. Wie schon im **Abschnitt 4.1.1** erwähnt ist *E. coli* ST131-O25b mit dem ESBL-Typ CTX-M-15 und Resistenz gegenüber Fluorchinolonen (im Folgenden als *E. coli* H30Rx bezeichnet) der weltweit am weitest verbreitete und häufigste Verursacher von Harnwegsinfektionen beim Menschen (33, 228) und gehört, basierend auf der *fimH* Typisierung, der Klade C an (101). Interessanterweise zeigte sich, dass *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende ST131 *E. coli* sich nicht mit H30Rx Isolaten in die Klade C eingruppierten. Stattdessen gehörten, bis auf eine Ausnahme (Isolat 177-10), alle Studienisolate der, durch *fimH22* definierten, Klade B, und dort Klade B3, an (**Abbildung 19**) (101). Isolat 177-10 zeigte sich in der Analyse in Klade C2 (*fimH30-Rx*) und wies entsprechend eine Fluorchinolonresistenz (Varianten *gyrA*-1B und *parC*-1aAB) auf; und trug zusätzlich zu *bla*<sub>CMY-2</sub> auch das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Die Untersuchung von 1 371 veröffentlichten ST131 Genomsequenzen zeigte, dass 18 weitere *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden *E. coli* Genomsequenzen aus unterschiedlichen geographischen Regionen ebenso das *fimH22* Allel trugen und bis auf eine Ausnahme mit IncI1 oder IncK2 Plasmiden assoziiert waren (**Abbildung 20**). Im Gegensatz dazu wiesen die *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Isolate, welche sich in die Klade C1-nM27, C1-M27 oder C2 einordneten, andere Plasmidcharakteristika, wie z.B. IncF, als genetischen Hintergrund für *bla*<sub>CMY-2</sub> auf.

Die extrem unterschiedliche Häufigkeit im Auftreten von ESBL-bildenden gegenüber CMY-2-bildenden *E. coli* in den unterschiedlichen ST131 Klade deutet darauf hin, dass die ST131 *E. coli* der verschiedenen Klade über unterschiedliche Anpassungsmechanismen an den menschlichen Wirt verfügen müssen,



und dass die *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragenden IncF Plasmide besser an Klade C *E. coli* Isolate angepasst sind als die *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden IncK und IncI1 Plasmide (229). Erste Untersuchungen zeigten, dass die erfolgreiche Verbreitung von *H30Rx* vermutlich mit dem Erwerb von Virulenzfaktoren, die auf dem IncF Plasmid kodiert sind, zusammenhängt, was letztendlich zu einer verbesserten Adaption an den menschlichen Harnwegstrakt führt (229). Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragende ST131 *E. coli* aus Klade B3 nicht so erfolgreich an den (Harnwegstrakt beim) Menschen adaptiert sind. Diese fehlende humanspezifische Adaption könnte die verhältnismäßig geringe Anzahl an *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden ST131 *E. coli* beim Menschen (13 %), die auch in anderen Studien beobachtet wurde, erklären (230-232) und wäre auch eine Erklärung für die relativ hohe ST131 Rate (12,2 %) bei Geflügelisolaten.

#### 4.2.2 Lokalisation von *bla*<sub>CMY-2</sub>

Gene die für ESBL und CMY kodieren sind häufig auf Plasmiden lokalisiert (60). Durch die Eigenschaft von Plasmiden sich horizontal oder vertikal in oder zwischen Populationen verbreiten zu können wird demnach auch maßgeblich die Verbreitung von Resistenzgenen in Populationen ermöglicht. In einzelnen Szenarios ließ sich der horizontale Gentransfer als Ursache für die Verbreitung des Resistenzgens bereits direkt nachweisen, wie z.B. die Ausbreitung eines einzigen identischen *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden IncA/C Plasmids in einem niederländischen Hühneraufzuchtbetriebs zeigte (233). Ein denkbarer Übertragungsweg der *bla*<sub>CMY-2</sub> Plasmide und Erklärung für die verschiedenen nachgewiesenen ST bei Mensch- und Tierisolaten wäre zudem der Transfer von Plasmiden im Intestinaltrakt des Menschen nach Aufnahme eines kontaminierten Lebensmittels von einem Nutztier- oder lebensmittelassoziierten *E. coli* auf einen human adaptierten Stamm (234). Daher wurden neben der *E. coli* Populationsstruktur auf Kerngenomebene auch die beteiligten mobilen genetischen Elemente, welche *bla*<sub>CMY-2</sub> beinhalten, untersucht. Es zeigte sich, dass *bla*<sub>CMY-2</sub> in den 164 Studienisolaten zum größten Teil in Plasmiden der Replikontypen IncI1 (n=61) und IncK2 (n=76) auftrat. Aus der Literatur war bekannt, dass *bla*<sub>CMY-2</sub> vornehmlich in Plasmiden der Replikontypen IncI1, IncA/C und IncK integriert vorliegt (62, 235). In Studien aus dem europäischen Raum (Norwegen, Niederlande, Schweden, Dänemark) über die Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> in der Lebensmittelkette, wurde *bla*<sub>CMY-2</sub> jedoch fast ausschließlich in IncI1 und IncK Plasmiden identifiziert (186, 222, 236). Weltweit betrachtet spielen dagegen, neben den IncI1 und IncK Plasmiden, vor allem die IncA/C Plasmide eine große Rolle bei der Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> (183, 237-241). IncA/C Plasmide stellen bei den 164 Studienisolaten jedoch nur in geringer Zahl den genetischen Hintergrund für *bla*<sub>CMY-2</sub> (n=4). Die Ursache für die unterschiedliche Prävalenz von IncA/C Plasmiden als *bla*<sub>CMY-2</sub> tragende Determinante in unterschiedlichen geographischen Regionen verbleibt spekulativ. Der Nachweis von IncA/C Plasmiden konzentriert sich in der Regel auf Nord- und Südamerika (50). Berichte über das Vorkommen in anderen genetischen Hintergründen (IncF, IncX, IncI2, IncHI2,

chromosomal) zeigten jedoch auch, dass die Integration von *bla*<sub>CMY-2</sub> nicht ausschließlich auf die Plasmidtypen IncI1, IncA/C und IncK beschränkt ist (184, 242). Bis auf wenige Ausnahmen (**Abbildung 18**) wurde *upstream* von *bla*<sub>CMY-2</sub> ein *ISEcp1* Element identifiziert (siehe auch **Abschnitt 4.2.2.3**). Die Verbindung von *bla*<sub>CMY-2</sub> mit *ISEcp1* scheint die Transposition von *bla*<sub>CMY-2</sub> in neue Zielstrukturen, wie die in dieser Studie beobachteten, chromosomalen Integrationen, zu befördern (35, 183).

Aufgrund der Dominanz der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragende IncK und IncI1 Plasmide in der vorliegenden Studie wurden Plasmide dieser Replikontypen detaillierter untersucht.

#### 4.2.2.1 IncK Plasmide

In 76 Isolaten wurde *bla*<sub>CMY-2</sub> auf einem IncK Plasmid nachgewiesen. IncK Plasmide formen zusammen mit IncI, B und Z zusammen den I-Plasmidkomplex und weisen Gemeinsamkeiten in ihren morphologischen und serologischen Pili Eigenschaften auf. IncK Plasmide sind in der Regel zwischen 80 und 150 kb groß, zeigen ein *narrow-host* Spektrum und tragen häufig *bla*<sub>CMY-2</sub> und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (50). Die Analyse der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden IncK Plasmide der Studienisolate zeigte, dass allen eine identische Plasmidgrundstruktur gemeinsam war, welches in drei leicht modifizierten Varianten vorlag (**Abbildung 17**). Der Großteil der ermittelten IncK Plasmide war jedoch, bis auf wenige SNPs, identisch zu zuvor beschriebenen *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden Plasmiden aus Norwegen, den Niederlanden und der Schweiz (126, 182, 188). Interessanterweise fielen alle *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden IncK Plasmide in die, von Seifert *et al.*, neu beschriebene Inkompatibilitätsgruppe IncK2 (182). Auch die Replikonsequenz (*incRNAI*) der in dieser Studie neu beschriebenen IncK Plasmid-Variante p486-16 zeigte ebenfalls die Zugehörigkeit zu IncK2. Die Plasmidgrundstrukturen von p486-16, pDV45 und pTMSA1088 waren zum größten Teil identisch. Bei allen drei Varianten kodierte der Großteil der Plasmidgrundstruktur für Gene, die an der DNA-Replikation und am konjugativen Transfer beteiligt sind. Die Integration des *ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*blc-sugE* Komplexes war an identischer Position im *tra*-Lokus zwischen den Genen *traT* und *traU* verortet. Die Plasmidsequenzen der drei Varianten unterschieden sich in einer ca. 6 kb langen Deletion in pTMSA1088 im Vergleich zu pDV45, sowie einer zusätzlichen 28,6 kb langen Nukleotidsequenz, welche in p486-16 vorlag (**Abbildung 17**). Die identische Integrationsstelle von *bla*<sub>CMY-2</sub> deutet auf eine einmalige Integration von *bla*<sub>CMY-2</sub> in ein gemeinsames IncK „Vorfahr“-Plasmid hin. Die Variationen der Plasmidgrundstruktur sind wahrscheinlich auf nachträglich auftretende Mobilisierungsereignisse zurückzuführen. Ein bemerkenswerter Unterschied der Varianten pTMSA1088 und pDV45 gegenüber p486-16 waren die unterschiedlichen Gene zur Plasmidstabilisierung: pTMSA1088 und pDV45 besitzen *relBE* und *pndAC*, während in p486-16 die Gene *pndAC* und *stbAB* und *parA* vorlagen. Die Anwesenheit der verschiedenen Stabilisationssysteme (Toxin/Antitoxin Systeme) stellt für die Plasmide einen

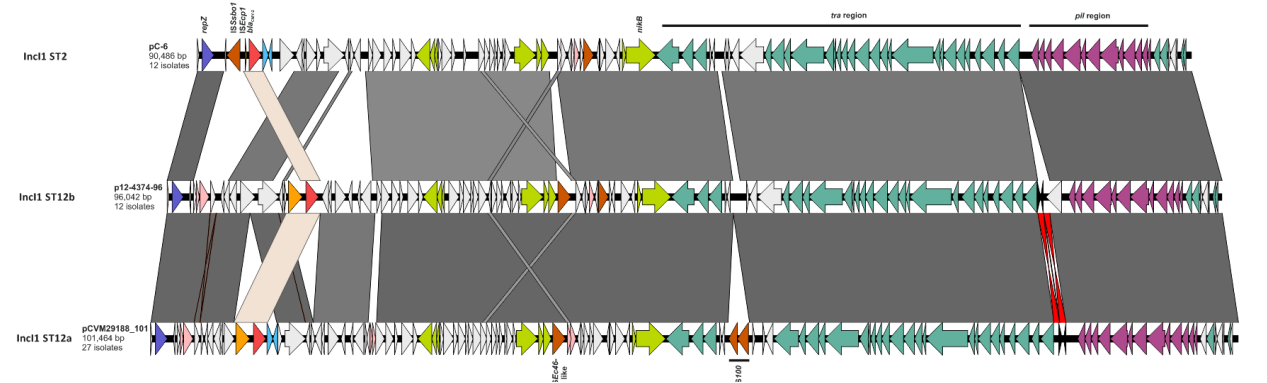
Selektionsvorteil dar und könnte eine Erklärung auf die Persistenz dieser Plasmidvarianten in Abwesenheit von Antibiotikaselektionsdruck sein und die verschiedenen auftretenden Häufigkeiten der Plasmidvarianten (**Tabelle 21**) erklären (188, 243). Weitere Unterschiede in den Plasmidsequenzen wurden aufgrund von Insertionen von MGEs, insbesondere IS-Elementen (**Tabelle 23**), sowie der variablen Shufflonregion beobachtet.

IncK Plasmide mit *bla*<sub>CMY-2</sub> wurden im Rahmen dieser Studie in allen untersuchten Reservoirs und bei 32 verschiedenen *E. coli* STs identifiziert. Diese Beobachtung deckt sich mit bisherigen Studien über die Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> aus dem europäischen Ausland, wo *bla*<sub>CMY-2</sub> bei verschiedensten STs nachgewiesen wurde (182, 186, 188, 222, 244). Der Nachweis von so hochkonservierten Plasmiden in unterschiedlichsten Reservoirs (Mensch, Nutztier, Lebensmittel) in Deutschland, sowie dem europäischen Ausland deutet auf eine Zirkulation dieses Resistenzplasmids in der *E. coli* Gesamtpopulation im europäischen Raum hin, basierend auf horizontalem Transfer durch Konjugation. Es wurden jedoch auch gleiche mobile genetische Elemente an identischen Positionen in Plasmidsequenzen von Isolaten gleicher klonaler Linien identifiziert (**Tabelle 23**). Neben der horizontalen spricht dies auch für eine vertikale, klonale Verbreitung der Plasmide. Beispielsweise ließ sich die Plasmidvariante pTMSA1088 fast ausschließlich in Kombination mit *E. coli* ST38 in Isolaten von Nutztieren und Lebensmittelproben beobachten. Die spezifische Kombination von Plasmid und Sequenztyp wurde ebenfalls in weiteren europäischen Ländern (Niederlande, Dänemark, Norwegen, Schweden) entlang der Hühnerfleischproduktionskette beobachtet und wirft die Frage auf, ob hier ein hochkonserviertes IncK2-Plasmid gut an *E. coli* ST38 adaptiert ist und/oder es eine europaweite klonale Ausbreitung von ST38 entlang der Hühnerfleischproduktionskette stattfindet (126, 182, 186, 188, 222). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Isolaten des ST429 in Kombination mit Plasmiden ähnlich zu p486-16 (**Abbildung 22**). Das ausschließliche Auftreten dieser Plasmidvariante bei *E. coli* ST429 in einigen Ländern Europas (Deutschland, Dänemark, Frankreich, Luxemburg), mit teilweise identischen MGE Insertionen in der Plasmidsequenz, impliziert ebenfalls eine vertikale Verbreitung dieser „Stamm-Plasmid“-Kombination.

#### 4.2.2.2 IncI1 Plasmide

IncI1 Plasmide wurden bei 61 Isolaten als *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragendes mobiles genetisches Element beobachtet. Wie auch IncK Plasmide gehören IncI1 Plasmide dem I-Komplex an. Es handelt sich um *low-copy-number*, *narrow-host* Spektrum Plasmide welche in ihrer Größe von 50 bis 250 kb variieren können (50). Im Gegensatz zu den IncK Plasmiden tritt bei IncI1 Plasmiden eine hohe Diversität in den Plasmidgrundstrukturen auf (126). Anhand des von García-Fernández *et al.* etablierten pMLST Schemas können IncI1 Plasmide typisiert, somit kategorisiert und untereinander unterschieden werden (55). Die

Ähnlich zu den IncK Plasmiden wurden auch die *bla*<sub>CMY-2</sub> tagenden IncI1 Plasmide in *E. coli* verschiedenster STs nachgewiesen. Aus der aktuellen Literatur ist bekannt, dass bei *E. coli* und *Salmonella* vorkommende Plasmide des Replikontyps IncI1 mit *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CMY-2</sub> möglicherweise mit einem vogelspezifischen Reservoir zusammenhängend sind (55). Das weltweite Auftreten von identischen pST2 und pST12 IncI1 Plasmiden mit *bla*<sub>CMY-2</sub> in verschiedensten Reservoirs legt daher die Vermutung nahe, dass *bla*<sub>CMY-2</sub> horizontal durch IncI1 Plasmide entlang der Lebensmittelkette zum Menschen hin verbreitet werden kann. Die eng verknüpften internationalen Produktionsketten könnten für die grenzübergreifende Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> eine wichtige Rolle spielen (186, 187).



**Abbildung 35: Schematische Abbildung der Incl1 Plasmide.** Die konservierte *bla*<sub>CMY-2</sub> Plasmidsequenz ist beige hinterlegt.

#### 4.2.2.3 Chromosomale Lokalisierung

Neben dem Plasmid-lokalisiertem *bla*<sub>CMY-2</sub> Gen wurde auch in einer nennenswerten Anzahl (n=20) von Isolaten ein chromosomal lokalisiertes *bla*<sub>CMY-2</sub> Gen gefunden. Eine Mobilisierung und Integration von *bla*<sub>CMY-2</sub> wurde vermutlich durch das *upstream* gelegene Insertionselement *ISEcp1* ermöglicht (251) (siehe **Abschnitt 1.1.2.3.3**). Es ist bekannt, dass *bla*<sub>CMY-2</sub> in das Chromosom von *P. mirabilis* und *S. enterica* integrieren kann (252, 253). Eine chromosomale Integration bei *E. coli* wurde von Naseer *et al.* diskutiert (232), bzw. von Fang *et al.* mittels *Southern Blot*-Hybridisierung nachgewiesen (184). Die hohe Diversität an Integrationsstellen im Chromosom der Studienisolate deutet auf unabhängige Mobilisierungs- und Integrationsereignisse hin (**Abbildung 18**). Erstaunlicherweise wiesen die Isolate mit vermuteter chromosomaler Integration (**Tabelle 25**) eine identische *bla*<sub>CMY-2</sub> Umgebung auf, die außerdem identisch zu einer aus China beschriebenen genetischen chromosomalen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub>, TN44889 (identisch zu FM246884 von Verdet *et al.*), war (184). Spontan auftretende Mobilisierungsereignisse dieses konservierten Elements aus einem Plasmid ins Chromosom könnten eine Erklärung für dessen Auftreten in *E. coli* unterschiedlicher STs sein.

Das Auftreten identischer Insertionssequenzen (*ISAp1*) in unmittelbarer Umgebung zu *bla*<sub>CMY-2</sub> bei eng verwandten ST1196 Isolaten zeigt außerdem, dass eine vertikale Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> durch Translokationen des Resistenzgens ins Chromosom ermöglicht wird.

Der Grund für den relativ hohen Anteil (26,1 %) an humanen Isolaten mit chromosomal lokalisiertem *bla*<sub>CMY-2</sub> im Vergleich zu Nutztier/Lebensmittel bleibt spekulativ. Er liegt jedoch im ähnlichen Bereich wie der Anteil an Isolaten mit chromosomal lokalisiertem *bla*<sub>CMY-2</sub> in einer norwegischen Studie (28,5 % chromosomales *bla*<sub>CMY-2</sub>) (232). Die ansonsten seltene Beobachtung von chromosomal lokalisierten *bla*<sub>CMY-2</sub> Genen in anderen Studien lässt die Vermutung zu, dass das Gen aufgrund niedrig auflösender Analyseverfahren fälscherweise einem plasmidalen Hintergrund zugeordnet wurde. Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass der *bla*<sub>CMY-2</sub>-Komplex mobiler und flexibler im genetischen Hintergrund ist, als der häufige Nachweis auf IncK, Inc11 und IncA/C Plasmiden vermuten lässt. Die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln mit anschließendem horizontalem Gentransfer von plasmidal vorliegendem *bla*<sub>CMY-2</sub> von einem nicht-human-adaptierten in einen human-adaptierten *E. coli* im Intestinaltrakt beim Menschen könnte eine weitere mögliche Erklärung für den viel höheren Anteil an chromosomal-lokalisiertem *bla*<sub>CMY-2</sub> beim Menschen sein (234).

#### 4.2.2.4 Direkte genetische Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub>

Das *bla*<sub>CMY-2</sub> Gen der Studienisolate wurde in einer Vielzahl von verschiedenen Replikontypen (Inc11, IncK, IncA/C Plasmide, Chromosom) identifiziert. Barlow und Hall demonstrierten anhand phylogenetischer Analysen verschiedener AmpC Gene, dass eine einmalige Mobilisierung von *bla*<sub>CMY-2</sub>,

vermittelt durch *ISEcp1*, aus dem Chromosom von *C. freundii* und die anschließende horizontale Verbreitung des Gens durch einen ursprünglichen gemeinsamen Vorfahren die wahrscheinlichste Erklärung für die Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> ist (251). Die konservierte genetische *bla*<sub>CMY-2</sub>-Umgebung der Studienisolate legt diese Schlussfolgerung nahe. Alle Isolate zeigten die, an der Mobilisierung von *bla*<sub>CMY-2</sub> beteiligte, *ISEcp1* Sequenz *upstream* von *bla*<sub>CMY-2</sub>, sowie *downstream* die Sequenzhomologie zum Abschnitt des *C. freundii* Chromosoms (*blc*, *sugE*, *ecnR*) auf.

Anders als bei vielen *bla*<sub>CTX-M</sub> Genen, liegt *ISEcp1* *upstream* von *bla*<sub>CMY-2</sub> intakt vor (254). Der Transpositionssmechanismus von *ISEcp1* ist nicht abschließend geklärt, vermutlich handelt es sich aber um einen *one-ended*-Mechanismus (255, 256). Das vollständige Vorliegen von *ISEcp1* kann daher vermutlich die erneute Transposition von *bla*<sub>CMY-2</sub> vermitteln, wie das Vorkommen von *ISEcp1* in verschiedenen Plasmidtypen und insbesondere den unterschiedlichsten chromosomalen Integrationsstellen zeigt.

Neben *ISEcp1* sind aber noch weitere MGEs für den erneuten weiteren horizontalen Transfer von *bla*<sub>CMY-2</sub> zwischen Enterobacteriaceae verantwortlich. Yassine *et al.* konnten anhand von Transferexperimenten zeigen, dass die Mobilisierung von *bla*<sub>CMY-2</sub> von einem IncA/C Plasmid in die Plasmidgrundstruktur von Inc1-pST2 Plasmiden durch *ISSbo1* vermittelt wurde (257). Die Anwesenheit von *IS4* *upstream* von *ISEcp1* und weiteren (jedoch trunkierten) IS-Elementen beim chromosomal lokalisierten *bla*<sub>CMY-2</sub> - Element TN44889 legt, analog zur Mobilisierung durch *ISSbo1*, die Vermutung nahe, dass diese Transposition nicht durch *ISEcp1* sondern durch *IS4* vermittelt wurde. Eine Ausnahme stellten die Sequenzen der Isolate 90-16, 216-16 und 502-16 dar, welche *upstream* ein intaktes *ISEcp1*-Element, aber kein *IS4*-Element zeigten. Die weiteren identifizierten IS-Elemente (bei den Isolaten 124-16: *IS5*; 740-12: *IS903B*) in mittelbarer genetischer Umgebung zu *bla*<sub>CMY-2</sub> waren vermutlich nicht an der Mobilisierung beteiligt, sondern später integriert.

#### 4.2.3 Beobachtungen zu Resistenz und Virulenz

ESBL-produzierende *E. coli* humanen Ursprungs weisen Fluorchinolonresistenzraten von 60 - 70% auf (105, 258). In der vorliegenden Studie waren 43,5 % der *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden Isolate vom Menschen resistent gegenüber Ciprofloxacin. Eine Ursache für Unterschiede in den Resistenzraten gegenüber ESBL-*E. coli* könnte der unterschiedliche Anteil an ST131 unter den Studienisolaten im Vergleich zu ESBL-Bildnern sein (95). Die Prävalenz von *E. coli*-ST131 bei ESBL-Bildnern von Harnwegsinfektionen oder aus nosokomialen Settings liegt bei bis zu 70 % (95). Dagegen gehörten fast alle *bla*<sub>CMY-2</sub> ST131-Isolate der Fluorchinolon-empfindlichen Klade B an, was ebenfalls die Rate an Fluorchinolonresistenz unter den Studienisolaten beeinflusst. Geringer als die beobachteten Raten bei Isolaten humanen Ursprungs war der Anteil an Fluorchinolonresistenz bei CMY-2 *E. coli* von Nutztieren oder Fleischprodukten. Die Raten

lagen jedoch im ähnlichen Bereich wie die Resistenzraten gegenüber Nalidixinsäure und Fluorchinolon bei *E. coli* von gesunden Hühnern aus Schweden (259).

Trotz beobachteter Carbapenemresistenz bei Isolat 10-16 konnte bei diesem Isolat keine Carbapenemase festgestellt werden. Neben Carbapenemasen ist aber auch beispielsweise CMY-2 in der Lage Imipenem zu hydrolysieren, wie Mammeri *et al.* zeigen konnten (260). Für die verringerte Carbapenemempfindlichkeit scheint daher vielmehr eine Kombination aus Porindefizienz und erhöhter *bla*<sub>CMY-2</sub> Expression verantwortlich zu sein (Isolat 10-16 wird bei Roschanski *et al.* als Isolat G-268-2 geführt) (261). Eine möglicherweise erhöhte *bla*<sub>CMY-2</sub> Expression könnte durch die beobachtete Nukleotidsubstitution in der *incRNA* vom *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden IncK Plasmid (99,98 % Ähnlichkeit zu KR905384.1) bedingt sein. Kurpiel *et al.* berichteten, dass eine Punktmutationen im Inc *anti-sense* RNA Gen zu einer veränderten RNA Faltstruktur führen kann, was die Plasmidreplikation-kontrollierenden *Pseudoknot Formation* inhibieren, und schließlich in einer erhöhten Plasmidkopiezahl resultieren kann (262). Die beobachtete Übertragbarkeit der Carbapenem-hydrolytischen Eigenschaft auf eine Transformante bei Roschanski *et al.* spricht für eine mobile Resistenzdeterminante (261). Die geringere Imipenem Empfindlichkeit des Wildtypisolats 10-16 gegenüber der Transformante unterstützt zusätzlich die Vermutung, dass der Verlust von Membranproteinen an der Ursache der Carbapenemresistenz beteiligt sind. Anhand der Sequenzdaten konnte gezeigt werden, dass die Membranproteine OmpF und OmpC eine Fehlfunktion haben, bzw. abwesend sind. Für die endgültige Erklärung für die Ursache der Carbapenemresistenz bei 10-16 müssen jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Das Colistinresistenzgen *mcr-1* wurde in zwölf Studienisolaten aus Schweinen (n=5), Hühnern (n=3), Hühnerfleisch (n=3) und einer Pute (n=1) identifiziert. In Deutschland wurde *mcr-1* bisher hauptsächlich in der Geflügelfleischproduktionskette nachgewiesen (263). Die vergleichsweise hohe Anzahl von *mcr-1* bei Isolaten vom Schwein in dieser Studie ist wahrscheinlich durch den Isolateauswahlprozess beeinflusst.

Ein Studienisolat (Isolat 6-16) wies das Shigatoxin Stx-2 auf. Shigatoxin-produzierende *E. coli* mit ESBL/AmpC-Bildung sind bisher nur selten beschrieben worden, die Gründe dafür sind nicht erforscht (264, 265).

#### 4.2.4 Limitationen

Die Untersuchung der CMY-2-bildenden *E. coli* unterliegt mehreren Einschränkungen die es zu berücksichtigen gilt. Zunächst wurde versucht die Sammlung an Nutztierisolaten möglichst divers aufzubauen um eine heterogene Stichprobe zu erreichen. Daher wurden innerhalb von Nutztierbetrieben die Isolate anhand ihrer Vortypisierungsergebnisse gewählt, z.B. die Auswahl von Isolaten verschiedener phylogenetischer Gruppen. Eine vollständig randomisierte Auswahl der Isolate, insbesondere aus der Masthähnchenproduktion, war daher nicht möglich. Des Weiteren war eine lange Probenahmezeit von fünf Jahren notwendig, da die Prävalenz von CMY-2-produzierendem *E. coli* bei 3. Generation Cephalosporin-resistenten *E. coli* beim Mensch vergleichsweise gering war. Aufgrund von fehlenden epidemiologischen Daten der Patientenisolat (Auslandsaufenthalt, Essverhalten) und Auskünften über Herkunft und Transportwege von Nutztieren und Fleischerzeugnissen war es zudem nicht möglich vermeintliche Zusammenhänge oder Transmissionen direkt zu bestätigen oder auszuschließen.

Das Studiendesign beinhaltete nicht die Nachverfolgung von Tieren von Aufzucht bis Schlachtprozess, wie für den direkten Nachweis einer Transmission nötig wäre. Zusätzlich basieren die angelegten Schwellenwerte für die Definition der genetischen Verwandtschaft auf vorherigen Studien und konnten nicht überprüft werden. Eine Validierung anhand der empfohlenen Kriterien von Belkum *et al.* war aufgrund der Auswahl der Studienisolate daher nicht vollständig möglich (83). Die Stabilität, Reproduzierbarkeit und Auflösungsvermögen der *ad hoc* cgMLST waren zwar gegeben, die epidemiologische Konkordanz und Testpopulation aber aufgrund des Studiendesigns nicht in vollem Umfang optimal. Eine gesicherte Aussage über die genetische Verwandtschaft zwischen Isolaten kann daher nicht getroffen, sondern diese nur abgeschätzt werden. Die Studienauswahl ermöglichte dennoch ein gutes Abbild der Diversität der Populationsstruktur von *bla*<sub>CMY-2</sub> tragenden *E. coli* in Deutschland und ließ einen internationalen Vergleich zu.



#### 4.2.5 Fazit

Die Analyse der *E. coli* Population, sowie der genetischen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub> und der Resistenzgen-tragenden MGE gaben Hinweise auf die Zusammensetzung der *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragenden *E. coli* Population und die Verbreitung des Resistenzgens zwischen verschiedenen Reservoirs innerhalb Deutschlands. Die im humanmedizinischen Bereich sehr häufig vorkommenden ESBL-bildenden *E. coli* des Sequenztyps ST131 konnten in detaillierten, genetischen Vergleichsanalysen deutlich von den CMY-2-bildenden *E. coli* ST131 von Mensch und Tier abgegrenzt werden, was auf unabhängige Evolution in verschiedenen Reservoirs hinweist. Identische *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragende IncK2 und IncI1 Plasmide wurden in einer Vielzahl klonaler *E. coli* Linien identifiziert; dies betraf Isolate von Patienten, Nutztieren und Lebensmittelproben. Nur bei ST38-IncK und ST429-IncK wurde die Assoziation von Sequenztyp und Plasmidtyp beobachtet. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Vermutung, dass die Hauptursache für Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> zwischen Mensch, Tier und Tierprodukt zum größten Teil durch horizontalen Gentransfer (Plasmidtransfer) vermittelt wird. Allerdings zeigt das gehäufte Vorkommen von eng verwandten ST429 *E. coli* mit identischen Plasmidvarianten sowie identischen Insertionselementen, dass in lokal begrenzter Umgebung (einzelne Nutztierbetriebe) und entlang der Lebensmittelkette vertikale Transmissionen als Ursache für die Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> (-tragenden Plasmiden) denkbar sind.

In den letzten 10 Jahren wurden in Deutschland und Europa CMY-2-bildende *E. coli* als Infektionserreger beim Menschen nur sehr selten nachgewiesen, während in einigen asiatischen Ländern, die zu den größten Geflügelfleischproduzenten der Welt gehören, CMY-2-bildende *E. coli* beim Menschen deutlich häufiger auftreten. Das große Reservoir von *bla*<sub>CMY-2</sub> bei Geflügel und Geflügelfleischprodukt birgt, in Kombination mit möglichen Adaptionsprozessen, Potential für eine verstärkte Verbreitung von *bla*<sub>CMY-2</sub> Plasmiden oder *bla*<sub>CMY-2</sub> *E. coli* beim Menschen.

### 4.3 Fitness Studie

Verschiedene Faktoren können das Persistieren einer Resistenz in einer Population/einem Organismus in Abwesenheit eines Selektionsdrucks ermöglichen. Eine Variante stellt die Ko-Selektion zur Resistenzdeterminante dar (266). Aber auch durch kompensatorische Mutationen können die negativen Effekte einer initialen Fitnesslast ausgeglichen werden (136, 137, 267).

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Resistenzgen-tragende Plasmide in einen isogenen Stammhintergrund übertragen, um den Einfluss eines Plasmiderwerbs auf die Fitnesseigenschaften der Isolate zu untersuchen. Anhand von Langzeitkultivierungen sollten schließlich Kompensationseffekte einer Fitnesslast hervorgerufen und diese mittels Ganzgenomsequenzierung identifiziert werden.

#### 4.3.1 Initialer Fitnessverlust

Verbreitete experimentelle Ansätze zur Ermittlung der bakteriellen Fitness sind Wachstumsmessungen, kompetitive Wachstumsversuche oder vergleichbare, auf vereinfachenden Parametern basierenden Ansätze. Die Kenngröße der Fitness wird basierend auf Vergleichen der Wachstumsraten, Generationszeit oder Endpunkt-OD zwischen einem Plasmid-tragenden und Plasmid-freien Isolat ermittelt (131, 268). Obwohl diese Methoden zwar die Komplexität einer natürlichen, selektierenden Umgebung vernachlässigen, bieten sie einen guten und vereinfachten Einblick in die ablaufenden physiologischen Prozesse und einen Ausgangspunkt um Fragen zur Wirkung von Plasmiden auf das Wirtsbakterium zu untersuchen (268). In der vorliegenden Studie wurde ein einfacher, vergleichender Wachstumsassay unter Laborbedingungen in Vollmedium zur Ermittlung der relativen Fitness gewählt. Die Fitnessdaten der erstellten Transkonjuganten zeigten, dass der Erwerb eines  $\beta$ -Laktamasegen-tragenden Plasmids nicht zwangsläufig einen Effekt auf die Fitness des Rezipienten *E. coli* K12 J53 hatte. Nur bei ca. der Hälfte der Transkonjuganten konnten negative Wachstumseffekte, und in einem Fall sogar ein positiver Wachstumseffekt beobachtet werden (**Abbildung 23**). Ein Zusammenhang zwischen Plasmidgröße oder Replikontyp auf die Fitness konnte nicht beobachtet werden; aufgrund der heterogenen Plasmid- bzw. Transkonjugantensammlung war ein Rückschluss auf einen Fitnesseffekt durch Parameter wie Plasmidgröße oder Replikontyp schwierig. Dass die Plasmidgröße dennoch Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* nehmen kann, wurde in einer Studie von Smith *et al.* beschrieben (269). Die Autoren beobachteten bei isogenen Klonen, dass die Anwesenheit größerer Plasmide eine verlängerte *lag* Phase als die von kleineren Plasmiden zur Folge hatte. Ein Fitnesseffekt dieser Art wurde in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen, was jedoch auch an den gewählten experimentellen Bedingungen liegen könnte. Die Beobachtung von Smith *et al.* zeigt, dass neben der Wachstumsrate weitere Faktoren für eine umfassende Fitnesscharakterisierung berücksichtigt werden müssen (268).

Das Auftreten einer Fitnesslast nach Plasmidaufnahme bei nur einem Teil der Transkonjuganten widerspricht der Annahme, dass die Akquisition eines Plasmids immer einen initialen negativen Fitnessseffekt, bedingt durch die zusätzliche Last der Plasmidreplikation, herbeiführen müsste (268). Anhand eines systematischen Reviews, in welchem die Fitnesskosten durch erworbene antimikrobiellen Resistenzen untersucht wurden, konnten die Autoren Vogwill und MacLean zeigen, dass die Aufnahme eines Plasmides zwar häufig mit Fitnesskosten einhergeht, es aber auch durchaus zu nur geringen bis keinen Fitnesskosten in den untersuchten Studien kam (131). Einen Zusammenhang zwischen Plasmidgröße und Fitnesslast wurde in dieser Studie nicht nachgewiesen. Die Autoren schlussfolgerten, dass es in der evolutionären Vergangenheit der Wirtsorganismen zu regelmäßigen Plasmidaufnahmen und -verlusten und dementsprechenden Adaptionsprozessen kam. Die Neuaufnahme eines Plasmids führt daher nicht zwangsläufig zu einem Fitnessverlust, sondern nur wenn es zu neuen Plasmid-Wirts-Kombinationen kommt oder die Plasmide neue, nicht adaptierte genetische Fragmente durch horizontalen Gentransfer erwerben. Diese Hypothese wird durch die Untersuchung historischer Isolate aus der Murray Collection unterstützt, welche zeigte, dass die „Plasmidpopulation“ von Isolaten der präantimikrobiellen Zeit keine grundlegend andere Zusammensetzung aufwies (270). Das Nichtvorhandensein von Fitnesskosten bei der Hälfte der untersuchten Transkonjuganten könnte durch eine zuvor erworbene Plasmid-Wirts-Adaption erklärt werden. Jedoch impliziert die Beobachtung der so unterschiedlichen Fitnesswerte nach Aufnahme von Plasmid p102/04 durch *E. coli* K12 J53 (K1: 107,23 %, K2: 95,58 % Fitness im Vergleich zum plasmidfreien *E. coli* K12 J53), dass weitere genetische Effekte einen weitaus größeren Einfluss auf die Fitness als Plasmid-Wirts-Adaptionen haben/nehmen können.

### 4.3.2 Genomvergleiche

Der erwähnte diametrale Fitnessseffekt zwischen den Transkonjuganten 102/04 K1 und 102/04 K2 liegt bei 11,6 %. Da anhand der Ganzgenomdaten Mutationen bei den transferierten Plasmiden der beiden Isolate ausgeschlossen werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Stämme durch chromosomale Mutationen bedingt ist. Zwischen 102/04 K1 und 102/04 K2 wurden acht Sequenzunterschiede, verursacht durch drei SNPs und fünf IS Elemente an unterschiedlichen Positionen beobachtet. Die drei SNPs, wie auch drei IS Elemente, traten in nicht kodierenden Regionen auf. Interessanterweise wies 102/04 K1 ein, durch ein IS Element, trunkiertes *sspA* Gen auf. *SspA* (*Stringent starvation protein A*) ist ein Stressprotein, welches unter Glukose-, Stickstoff-, Phosphat- oder Aminosäure-limitierenden Bedingungen exprimiert wird (271, 272). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass *sspA* für die Stressantwort während der stationären Phase und unter nährstoffbegrenzten Bedingungen in *E. coli* wichtig ist. Die Expression von *sspA* wird durch die

Anwesenheit von *relA* positiv reguliert und steigt zudem mit abnehmender Wachstumsrate an (272). Die genaue Rolle von SspA in der Transkription und Zellphysiologie ist noch unklar. Williams *et al.* konnten zeigen, dass es durch eine Deletion von *sspA* in der exponentiellen Wachstumsphase zu einer veränderten Expression von mindestens 11 Proteinen kam (272). Darüber hinaus zeigten sich *sspA* Mutanten unter längeren Nährstoff-limitierenden Bedingungen oder langen stationären Phasen als weniger fit/überlebensfähig als der Wildtyp (272). Hansen *et al.* konnten außerdem zeigen, dass *sspA* für die Regulation der Säuretoleranz bei *E. coli* notwendig ist (271). Säuretoleranz stellt eine wichtige Fähigkeit von Darmbakterien dar, um den niedrigen pH-Wert bei der Magenpassage zum Darmtrakt zu überleben (273). Der Verlust von *sspA* mag daher unter artifiziellen Wachstumsbedingungen einen vermeintlichen Fitnessvorteil hervorrufen, unter natürlichen Bedingungen (beispielsweise im menschlichen Wirt) ist aber davon auszugehen, dass der Verlust von *sspA* sich nachteilig auf die Fitness (bzw. Überlebensfähigkeit) von *E. coli* auswirkt.

Neben *sspA* wurde bei 102/04 K1 auch *oxyR* trunkiert aufgefunden. OxyR stellt einen DNA-bindenden Transkriptionsregulator für oxidativen Stress und ist indirekt durch seinen Einfluss auf die mRNA Stabilität an der Regulation von mehr als 40 verschiedenen Genprodukten beteiligt (274).

#### 4.3.2.1 IS10

Die Anzahl an Unterschieden zwischen den zwei 102/04 G<sub>0</sub> Chromosomen ist mit drei SNPs und fünf IS Elementen (vier *IS10R* Elemente und ein *IS1A* Element) an unterschiedlichen Position erstaunlich hoch. Insbesondere die Mobilität und Anzahl von *IS10R* im Chromosom ist bemerkenswert. Insgesamt wurden neun *IS10R* Kopien bei 102/04 K1, acht bei 102/04 K2 und sechs bei RS165 K1 identifiziert. Weder das Plasmid p102/04, noch das Plasmid pRS165 trugen initial *IS10R*. Daher kann vermutet werden, dass der eingesetzte Laborstamm *E. coli* K12 J53 *IS10R* schon im Vorfeld erwarb. Da *IS10* keine natürliche genetische Komponente von *E. coli* ist, gehen Kovarik *et al.* davon aus, dass die Integration von *IS10* in das Chromosom von *E. coli* Stämmen häufig ein artifizieller Nebeneffekt von Klonierungsschritten ist (275). Eine Analyse der Genomsequenzen der ursprünglichen *E. coli* K12 Stämme MG1655 (GenBank Accession No. NC\_000913.3) und K12 J53 (GenBank Accession No. GCF\_000258865.1, sequenzierter Laborreferenzstamm aus Südkorea) zeigte, dass diese Stämme negativ für *IS10* Elemente waren (276). Die Herkunft von *IS10R* im verwendeten Laborstamm konnte nicht abschließend geklärt werden. *IS10R* gehört der *IS4* Familie an und, obwohl *IS10* ursprünglich als Bestandteil des Transposons Tn10 identifiziert wurde, stellt es ein unabhängiges mobiles genetisches Element dar (277). Bei *E. coli* wird Tn10/*IS10* zum einen durch die Dam-Methylierung, welche die Expression der Transposase herabreguliert und Bindungsaffinität der Transposase mindert, und durch die *anti-sense* RNA der Transposase negativ reguliert (277, 278). Die *anti-sense* Regulation spielt eine ebenfalls eine wichtige

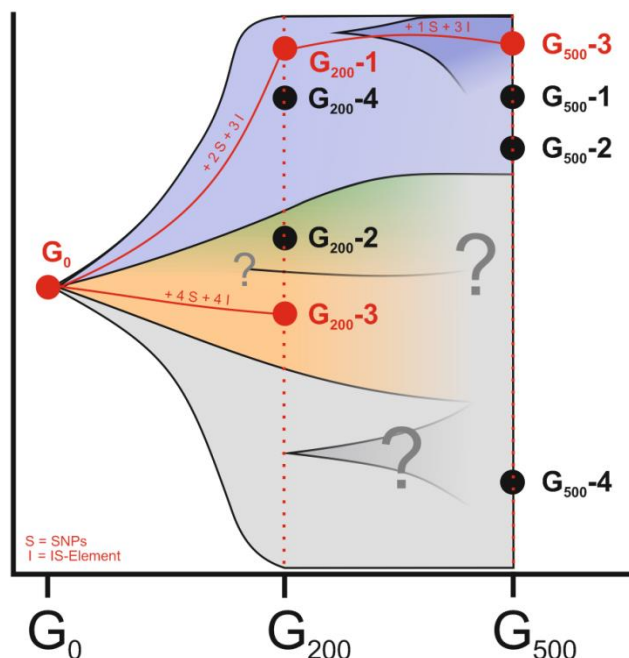
Rolle in der IS10 Transpositionsinhibition, wenn das Transposon auf *multi-copy* Plasmiden vorliegt (*multi-copy inhibition*). Auf einem *multi-copy* Plasmid verringert IS10 beispielsweise die Transpositionshäufigkeit von Tn10 um den Faktor 10 und reduziert ebenfalls die Transpositionshäufigkeit von IS10 (279). Die von Kovarik *et al.* beobachtete Präferenz von IS10 zur Transposition auf Plasmide konnte anhand der vorliegenden Daten, auch nach längerer Kultivierung, nicht bestätigt werden (275). Die Konjugation der Plasmide in den Rezipientenstamm *E. coli* K12 J53 hatte daher vermutlich keinen Einfluss auf die IS10 Regulation. Stattdessen war nach der Langzeitkultivierung der Isolate sogar eine noch höhere Anzahl an IS10 Elementen in den Genomsequenzen beobachtbar. Das G<sub>200</sub> Isolat von 102/04 K2 zeigte zwei zusätzliche IS10R, das G<sub>200</sub> Isolat und die G<sub>500</sub> Isolate von RS165 K1 hatten jeweils 3 - 4 zusätzliche IS10 Kopien. Eine Integration in die Plasmide war auch hier nicht nachweisbar.

Sawyer *et al.* beobachteten, dass selbst eng verwandte *E. coli* Stämme sich dramatisch in der Kopienzahl und im IS Element unterscheiden können (280). Matsutani *et al.* konnten zudem am Beispiel von *E. coli* und *Shigella* spp. Stämmen zeigen, dass die IS10 Kopienzahl zwischen 0 - 9 Kopien variierte (281). Ob sich im Laufe der Langzeitexperimente weitere IS10 Kopien durch Transpositionen im Chromosom der langzeitkultivierten Isolate und weiterer Transkonjuganten festgesetzt hätten kann nur spekuliert werden und bedarf der Untersuchung der Genomsequenzen weiterer Isolate. Die Anwesenheit und Anzahl von IS10 bei RS165 K1 und 102/04 K1/2 spricht aber dafür.

Aufgrund der hohen Mobilität der IS10 Elemente und der vergleichbar niedrigen Anzahl der aufgetretenen SNPs in den Langzeitversuchen, liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten (adaptiven) Finesseffekte durch IS10-trunkierte Gene verursacht wurden. Neben den bekannten negativen Effekten, wie z.B. der Verlust essentieller Gene, können Mutationen durch mobile genetische Elemente auch vorteilhaft für den Organismus sein; neben Deletionen können beispielsweise genetische Regionen dupliziert werden (282). Duplikationen bieten ein genetisches Potential, welches Zellen, mit einer erhöhten Kopieanzahl einer spezifischen Region, unter selektierenden Bedingungen begünstigen kann. Weiterhin können IS Elemente als Promotor für angrenzende Gene fungieren und somit Expressionsmuster verändern (282). Die beobachteten Insertionen von IS10 in *sspA* und *oxyR* bei 102/04 K1 könnte daher einen Einfluss auf das Expressionsmuster des Stamms gehabt und somit zu einer höheren Fitness als 102/04 K2 geführt haben. Der beobachtete Rückgang der Fitness von 107,23 % bei Generation G<sub>0</sub> auf 99,04 % bei Generation G<sub>500</sub> könnte durch die anschließend auftretenden chromosomalen Insertionen bedingt sein.

### 4.3.3 Langzeitkultivierung

Während der Langzeitkultivierung war von Generation  $G_{200}$  zu  $G_{500}$  ein abnehmender Trend in der relativen Fitness der Stämme ersichtlich. Dies ist insbesondere dahingehend erstaunlich, als dass nach Beobachtungen beim *Long-term Experimental Evolution Project* (LTEE) von Richard Lenski eine permanente Zunahme der relativen Fitness der Isolate über 60 000 Generationen zu beobachten war (283). Da sich aber auch beim passagierten plasmidfreien Rezipientenstamm *E. coli* K12 J53 eine leichte Abnahme der relativen Fitness im Vergleich zu Generation 0 zeigte, ist zu vermuten, dass andere Fitness-determinierende Effekte, welche durch den verwendeten Experimentieransatz zur Fitnessermittlung nicht abgebildet werden können, die Populationen der Langzeitkulturen im Laufe der experimentellen Evolution bestimmten. Durch direkte kompetitive Wachstumsversuche hätte vermutlich die Diskrepanz zwischen erwarteter Fitnesszunahme und beobachtetem Fitnessverlust besser abgebildet werden können. Zudem stellt die Passagierung eine große Hürde für weniger kompetitive Klone dar. Durch die Überimpfung geringer Volumina Kultur wurden vermutlich Klone mit weiteren Fitnessfaktoren als nur einer hohen Wachstumsrate selektiert, beispielsweise einer höheren End-OD. Über den Verlauf der Passagierung führte dies vermutlich zur Verdrängung der vermeintlich fitteren Klone. Die Beobachtung, dass eine hohe Endpunkt-OD oftmals nicht bei Isolaten mit den höchsten Wachstumsraten auftritt, unterstützt diese Vermutung.



**Abbildung 36: Schematische Darstellung einer möglichen Populationsentwicklung von RS165K1 über den Verlauf der Langzeitkultivierung.**

Die Flächen der einzelnen Linien sind nicht repräsentativ dargestellt. Anhand der Ganzgenomsequenzierung und des Wachstumsverhaltens kann auf verschiedene, sich entwickelnde Subpopulationen in der transferierten Kultur geschlossen werden. In rot dargestellt sind Ganzgenom-sequenzierte Isolate und deren vermutete Verwandtschaft anhand identischer SNPs. In schwarz dargestellt sind Isolate, welche anhand ihres Wachstumsverhalten in Subklone eingeordnet wurden.  $G_{200-4}$ ,  $G_{500-1}$  und  $G_{500-2}$  zeigten dabei ein Wachstumsverhalten ähnlich zu sequenzierten Isolaten und wurden dieser Linie zugeordnet.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten und die genetischen Unterschiede bei Isolaten einer Generation zeigten, dass es zur Ausprägung verschiedener Sublinien vom Ursprungsklon kam. Ob die zu den Sublinien führenden Mutationen sich in der Population etablierten, konnte aufgrund der geringen Stichprobe der sequenzierten Isolate nicht untersucht werden. Der Nachweis von identischen SNPs und

Insertionselementen bei RS165K1 G<sub>200</sub> und G<sub>500</sub> deutet jedoch darauf hin, dass sich der Subklon RS165K1 G<sub>200</sub> in der Population etabliert hat (**Abbildung 36**). Ganzgenomsequenzierungen weiterer Isolate oder der gesamten Population hätten hier weiteren Aufschluss über die Populationszusammensetzung geben können.

Dass es zu Anpassungen der Zellen an die Plasmide und die Wachstumsbedingungen kam, ließ sich aus dem Wachstumsverhalten der einzelnen Transkonjuganten schließen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sich unter selektierenden Bedingungen eine adaptive Evolution an die Resistenzgen-tragenden Plasmide einstellte, welche die Fitnesskosten eines Plasmiderwerbs kompensierte (284-286). Adaptive Änderungen während Co-Evolutionsexperimenten traten dabei regulatorisch meist im bakteriellen Wirtschromosom und nicht in den Plasmiden auf (285, 287-289). Das Auftreten nahezu aller Mutationen im bakteriellen Wirtschromosom der evolvierten Transkonjuganten in der vorliegenden Studie spricht für die beschriebene chromosomal bedingt Anpassung. Die hohe Mobilität der IS Elemente ausgeschlossen, traten bei 500 Generationen lang evolvierten Isolaten maximal 2-4 SNPs auf. Im vergleichbaren LTEE wurden im Laufe der ersten 20 000 Generationen 45 SNPs beobachtet, die jedoch nicht linear sondern in den frühen Generationen gehäuft auftraten (283). Ob und welche SNPs oder inserierten IS Elemente Auswirkungen auf die Genregulation und damit der Fitness der Transkonjuganten haben, wurde nicht abschließend geklärt. Dass Fitnesskompensation grundsätzlich durch regulatorische Effekte und beispielsweise auch *copy number* Reduktion der Plasmide bedingt sein können, zeigten Studien von Harrison *et al.* und San Millan *et al.* (288, 289). Im Gegensatz dazu beobachteten Porse *et al.*, dass positive Adaptionen durch Deletionen großer Plasmidregionen erreicht wurden.

#### 4.3.4 Fazit, Limitationen und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der Erwerb eines Resistenzplasids unter Umständen zu einem Fitnessverlust für das Wirtsbakterium führte. Erworbene Fitnesskosten wurden zudem innerhalb weniger Generationen durch kompensatorische Effekte ausgeglichen. Der Nachweis von Resistenzplasmiden in langzeitkultivierten Isolaten ohne selektiven Druck zeigte zudem, dass die Plasmide in der Lage sind sich der Population zu stabilisieren. Mit Hilfe der Ganzgenomdaten wurden Mutationen im Wirtschromosom identifiziert. Eine kompensatorische Evolution von Bakterien kann das weit verbreitete Auftreten von Antibiotikaresistenzplasmiden erklären und erlaubt es zudem Bakterien, horizontal erworbene Plasmide auch in Umgebungen zu halten, in denen die Plasmidgene nicht sofort nützlich sind. *Post-segregational killing systems* ermöglichen dabei oftmals eine erste Stabilisierung der Plasmide im Wirt. Die nachfolgende kompensatorische Evolution kann dann die permanente Fixierung eines Antibiotikaresistenz-Plasmid in einer Bakterienpopulation sichern.

Die vorliegende Studie unterliegt jedoch aufgrund des experimentellen Aufbaus einigen Limitationen. Grundsätzlich ist es wichtig neben der Wachstumsrate weitere phänotypische Fitnessmerkmale (z.B. Biofilmbildung, Substratverwertung) zu erfassen um eine umfassende Einschätzung der verschiedenen Fitness- und Kompensationseffekte zu erhalten. Zudem erfolgte die Messung der Fitness relativ und nicht kompetitiv. Über einen kompetitiven Wachstumsansatz wären zudem weitere Wachstumsmerkmale als die reine Wachstumsrate in den Fitnessparameter eingeflossen. Des Weiteren erfolgte keine vordefinierte Plasmidauswahl nach Größe und Replikontyp. Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* K12 J53 bedingt durch Plasmideigenschaften sind daher schwierig bis nicht möglich zu treffen.

Da in der vorliegenden Studie keine (RS165 K1) oder kaum (102/04 K1  $G_{500}$ ) Mutationen der Plasmidsequenzen beobachtet wurden, ist zu vermuten, dass chromosomale Effekte für die erhöhten Fitnesswerte verantwortlich waren.

Ansatzpunkt für weitere Studien könnte daher sein, Plasmide aus evolvierten Transkonjuganten erneut in den Generation  $G_0$  Rezipientenstamm oder in die zuvor Plasmid-bereinigten Wildtyp-Wirtsisolate, bzw. Generation  $G_0$  Plasmide in evolvierte Plasmid-bereinigte Transkonjuganten zu transferieren. Zudem könnten weitere Fitness-charakterisierende Tests, wie z.B. Biofilmbildung und Substratverwertung ermittelt werden.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der, in den letzten Jahren, beobachtete weltweite Anstieg von extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-bildenden *Escherichia coli* im humanmedizinischen Bereich wird, aufgrund der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten dieser Erreger, mit großer Sorge beobachtet. Weiterhin sind ESBL- sowie auch AmpC  $\beta$ -Laktamase-bildende *E. coli* auch bei verschiedenen Tierarten, in der Umwelt und in Lebensmitteln weit verbreitet. Das Vorkommen verschiedener Resistenzreservoirs, sowie die häufige Lokalisation von ESBL-Genen auf Plasmiden, bergen das Potential für eine zoonotische Verbreitung der Resistenzdeterminanten, beispielsweise entlang der Lebensmittelkette. Diese Dissertation hatte daher das Ziel die Populationszusammensetzung ESBL- und AmpC-bildender *E. coli* aus Deutschland zu charakterisieren um Aussagen über ein mögliches Transferpotential zu treffen.

Ziel der ersten Studie war die Untersuchung der Populationszusammensetzung ESBL-bildender *E. coli* Isolate aus nosokomialen und ambulanten Hintergrund sowie der gesunden Allgemeinbevölkerung in Deutschland. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 529, im Vorfeld gesammelte, ESBL-bildende Isolate phylogenetisch charakterisiert. Die Analyse zeigte einen hohen Anteil der, weltweit dominanten, human-spezifischen Linie *E. coli* Sequenztyp (ST)131 im Krankenhaus und ambulanten Bereich, welcher zudem deutlich höher als in der Normalbevölkerung war. Zudem wurde ein gehäuftes Vorkommen weiterer Sequenztypen, wie ST410, ST10, ST38 und ST69, welche auch regelmäßig als ESBL-bildende *E. coli* Linien bei Nutztieren und Lebensmitteln nachgewiesen wurden, beobachtet.

In einer zweiten Studie wurde untersucht, ob es zu einem möglichen Sektor-übergreifenden Austausch oder eine Transmission von AmpC-(CMY-2)-bildenden *E. coli* entlang der Nahrungskette kommt. Hierfür wurden 164 CMY-2-bildende *E. coli* vom Menschen, Nutztier und Lebensmittel Ganzgenom-sequenziert und nachfolgend phylogenetisch analysiert. Anhand dieser Daten wurden identische *bla*<sub>CMY-2</sub>-tragende IncK2 und IncI1 Plasmide in einer Vielzahl klonaler *E. coli* Linien, unter anderem auch ST131, identifiziert. Die Ergebnisse deuteten auf den horizontalen Gentransfer als Hauptursache für die Verbreitung der AmpC  $\beta$ -Laktamase CMY-2 zwischen Mensch, Tier und Tierprodukt in Deutschland hin. Zudem konnte die im humanmedizinischen Bereich sehr häufig vorkommenden ESBL-bildende Linie *E. coli*-ST131 Linie genetisch deutlich von den CMY-2-bildenden *E. coli*-ST131 von Mensch und Tier abgegrenzt werden.

Da bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen der horizontale Gentransfer eine elementare Rolle spielt, wurden in der dritten Studie die Auswirkungen des Erwerbs eines Resistenzgen-tragenden Plasmids und die nachfolgenden Anpassungsmechanismen an das Wirtsbakterium untersucht. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten, dass der Erwerb eines solchen Plasmids nur unter Umständen

zu einem Fitnessverlust für das Wirtsbakterium führt und erworbene Fitnesskosten zudem innerhalb weniger Generationen durch kompensatorische Effekte ausgeglichen werden können.

## 6 SUMMARY

The worldwide increase of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in human medicine in recent years is of great concern, due to the limited treatment options of these pathogens. Furthermore, ESBL- and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* are also widespread in various animal species, in food and in the environment. These various resistance reservoirs and the frequent localisation of ESBL/AmpC genes on plasmids entail the risk for their zoonotic distribution, e.g. along the food chain. Therefore, the present dissertation aimed to characterize the population structure of ESBL- and AmpC-producing *E. coli* from Germany in order to provide information about the potential of resistance gene transfer.

The aim of the first study was to investigate the population structure of ESBL-producing *E. coli* isolates from hospitalized patients and outpatients and healthy probands of the general population in Germany. For this purpose, a total of 529 ESBL-producing isolates, collected beforehand, were phylogenetically characterized. The analysis showed a high proportion of the worldwide dominant, human-specific clonal lineage *E. coli* sequence type (ST)131 in hospitalized patients and outpatients, which was also considerably higher than in the general population. In addition, a frequent occurrence of other sequence types, such as ST410, ST10, ST38 and ST69, was observed; these were also detected as ESBL-producing *E. coli* lineages in farm animals and foodstuffs.

In the second study, the genetic relationship of AmpC(CMY-2)-producing *E. coli* isolates from humans and animals was investigated to determine whether there is a possible cross-sectoral exchange or transmission along the food chain. For this purpose the whole genomes of 164 CMY-2-producing *E. coli* from humans, farm animals and foodstuffs were sequenced and phylogenetically analysed. Based on this data, identical *bla*<sub>CMY-2</sub>-bearing IncK2 and IncI1 plasmids were identified in a variety of *E. coli* lineages, including ST131. These results indicate that the horizontal gene transfer might act as the main cause for the spread of AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 between humans, animals and animal products in Germany. Furthermore, on genetic level the CMY-2-producing *E. coli*-ST131 in humans and animals could be clearly differentiated from the ESBL-producing *E. coli*-ST131 *E. coli*.

Since horizontal gene transfer plays a fundamental role in the spread of antibiotic resistance, the third study investigated the effects of acquisition of a resistance gene carrying plasmid and the subsequent adaptation mechanisms to the host bacterium. The results showed that the acquisition of such a plasmid does not necessary lead to a loss of fitness for the host bacteria and that acquired fitness costs can be compensated within a few generations.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Madigan M, Martinko J.** Brock, Mikrobiologie. 11., aktualisierte Auflage ed: Pearson Studium; **2008**.
2. **Emmerson AM, Jones AM.** The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemother. **2003**;51 Suppl 1:13-20.
3. **King DE, Malone R, Lilley SH.** New classification and update on the quinolone antibiotics. Am Fam Physician. **2000**;61(9):2741-8.
4. **Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ.** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat Rev Microbiol. **2010**;8(6):423-35.
5. **Hahn H.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: Springer Medizin Verlag Heidelberg; **2008**.
6. **Muller A, Wenzel M, Strahl H, Grein F, Saaki TN, Kohl B, et al.** Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. Proc Natl Acad Sci U S A. **2016**.
7. **Strominger JL, Tipper DJ.** Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents. Am J Med. **1965**;39(5):708-21.
8. **Bush K, Fisher JF.** Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol. **2011**;65:455-78.
9. **Kuriyama T, Karasawa T, Williams DW.** Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare. Biofilms in Infection Prevention and Control. Boston: Academic Press; **2014**. p. 209-44.
10. **Drawz SM, Bonomo RA.** Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. **2010**;23(1):160-201.
11. **Valenza G, Nickel S, Pfeifer Y, Eller C, Krupa E, Lehner-Reindl V, et al.** Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community. Antimicrob Agents Chemother. **2014**;58(2):1228-30.
12. **Malouin F, Bryan LE.** Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother. **1986**;30(1):1-5.
13. **Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Diaz D, Suarez AI, Tran J, et al.** Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. **1999**;43(7):1669-73.
14. **Poole K.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. **2004**;10(1):12-26.
15. **Livermore DM.** Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother. **1998**;41 Suppl D:25-41.
16. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. **1995**;39(6):1211-33.

17. **Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al.** A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* **1991**;276 ( Pt 1):269-70.
18. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(3):969-76.
19. **Livermore DM, Woodford N.** The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **2006**;14(9):413-20.
20. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **2001**;14(4):933-51, table of contents.
21. **Pfeifer Y.** ESBL, AmpC und Carbapenemasen: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik Beta-Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger. *J Lab Med.* **2010**;34(4):11.
22. **Datta N, Kontomichalou P.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* **1965**;208(5007):239-41.
23. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **2005**;18(4):657-86.
24. **Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P.** Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* **1988**;10(4):879-84.
25. **Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J.** Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **1990**;34(2):219-24.
26. **Livermore DM.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* **1995**;8(4):557-84.
27. **Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C.** SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(10):2856-61.
28. **Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **1985**;28(2):302-7.
29. **Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* **1990**;18(5):294-8.
30. **Ewers C, Bethe A, Wieler LH, Guenther S, Stamm I, Kopp PA, et al.** Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. *Int J Antimicrob Agents.* **2011**;37(1):86-7.
31. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(1):1-14.
32. **Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC.** CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* **2012**;3:110.
33. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* **2011**;66(1):1-14.

34. **Bergstrom S, Lindberg FP, Olsson O, Normark S.** Comparison of the overlapping *frd* and *ampC* operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **1983**;155(3):1297-305.
35. **Jacoby GA.** AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2009**;22(1):161-82.
36. **Guerin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC.** Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated beta-Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother.* **2015**;59(12):7753-61.
37. **Jaurin B, Grundstrom T, Edlund T, Normark S.** The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature.* **1981**;290(5803):221-5.
38. **Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S.** Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* **1989**;17(5):316-21.
39. **Denisuik AJ, Lagace-Wiens PR, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, et al.** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68 Suppl 1:i57-65.
40. **Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Giamarellou H.** Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **1996**;40(1):221-4.
41. **Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y.** Comparative characterization of the cephamycinase *bla*<sub>CMY-1</sub> gene and its relationship with other beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **1996**;40(8):1926-30.
42. **Kaase M.** Carbapenemasen bei gramnegativen Erregern in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* **2012**;55:1401-4.
43. **Nordmann P.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* **2014**;44(2):51-6.
44. **Siguié P, Gournayre E, Chandler M.** Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* **2014**;38(5):865-91.
45. **Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* **2005**;3(9):722-32.
46. **Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD.** The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* **2015**;28(3):565-91.
47. **Whittle G, Salyers AA.** Bacterial Transposons - An increasingly diverse group of elements. In: Streips U, Yasbin R, editors. *Modern Microbial Genetics*. 1. New York: Wiley-Liss, Inc.; **2002**.
48. **Poirel L, Kampf P, Nordmann P.** Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(12):4038-40.

49. **Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P.** Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**;201(2):237-41.
50. **Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al.** Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* **2018**.
51. **Watanabe T, Nishida H, Ogata C, Arai T, Sato S.** Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in Enterobacteriaceae. VII. Two Types of Naturally Occurring R Factors. *J Bacteriol.* **1964**;88:716-26.
52. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* **2005**;63(3):219-28.
53. **Datta N, Hedges RW.** Compatibility groups among fi - R factors. *Nature.* **1971**;234(5326):222-3.
54. **Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K.** Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* **2015**;6:242.
55. **Garcia-Fernandez A, Chiarretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al.** Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* **2008**;61(6):1229-33.
56. **Garcia-Fernandez A, Villa L, Moodley A, Hasman H, Miriagou V, Guardabassi L, et al.** Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother.* **2011**;66(9):1987-91.
57. **Hancock SJ, Phan MD, Peters KM, Forde BM, Chong TM, Yin WF, et al.** Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. *Antimicrob Agents Chemother.* **2017**;61(2).
58. **Bousquet A, Henquet S, Compain F, Genel N, Arlet G, Decre D.** Partition locus-based classification of selected plasmids in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* spp.: an additional tool. *J Microbiol Methods.* **2015**;110:85-91.
59. **Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F.** A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* **2004**;28(1):79-100.
60. **Carattoli A.** Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* **2013**;303(6-7):298-304.
61. **Manageiro V, Ferreira E, Pinto M, Canica M.** First description of OXA-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* **2014**;58(12):7613-4.
62. **Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(6):2227-38.
63. **Johnson JR, Russo TA.** Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* **2005**;295(6-7):383-404.
64. **Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, et al.** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol.* **2007**;297(3):163-76.



65. **Kohler CD, Dobrindt U.** What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol. **2011**;301(8):642-7.
66. **Pitout JD.** Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol. **2012**;3:9.
67. **Russo TA, Johnson JR.** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect. **2003**;5(5):449-56.
68. **Ochman H, Selander RK.** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J Bacteriol. **1984**;157(2):690-3.
69. **Chaudhuri RR, Henderson IR.** The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infect Genet Evol. **2012**;12(2):214-26.
70. **Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J Bacteriol. **1990**;172(11):6175-81.
71. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. **2010**;8(3):207-17.
72. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. **2000**;66(8):4555.
73. **Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM.** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. **2013**;5(1):58-65.
74. **Bisercic M, Feutrier JY, Reeves PR.** Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. J Bacteriol. **1991**;173(12):3894-900.
75. **Milkman R, Crawford IP.** Clustered third-base substitutions among wild strains of *Escherichia coli*. Science. **1983**;221(4608):378-80.
76. **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A. **1998**;95(6):3140-5.
77. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. **2006**;60(5):1136-51.
78. **Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al.** Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics. **2008**;9:560.
79. **Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS.** Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. Nature. **2000**;406(6791):64-7.
80. **Clermont O, Gordon D, Denamur E.** Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. Microbiology. **2015**;161(Pt 5):980-8.

81. **Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18(7):646-55.
82. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **1995**;33(9):2233-9.
83. **van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al.** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* **2007**;13 Suppl 3:1-46.
84. **Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al.** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* **2013**;11(10):728-36.
85. **Junemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, et al.** Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol.* **2013**;31(4):294-6.
86. **Ferdous M, Kooistra-Smid AM, Zhou K, Rossen JW, Friedrich AW.** Virulence, antimicrobial resistance properties and phylogenetic background of non-H7 enteropathogenic *Escherichia coli* O157. *Front Microbiol.* **2016**;7:1540.
87. **Mellmann A, Bletz S, Boking T, Kipp F, Becker K, Schultes A, et al.** Real-Time Genome Sequencing of Resistant Bacteria Provides Precision Infection Control in an Institutional Setting. *J Clin Microbiol.* **2016**;54(12):2874-81.
88. **Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al.** Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One.* **2011**;6(7):e22751.
89. **Henri C, Leekitcharoenphon P, Carleton HA, Radomski N, Kaas RS, Mariet JF, et al.** An Assessment of Different Genomic Approaches for Inferring Phylogeny of *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol.* **2017**;8:2351.
90. **Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al.** The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol.* **2008**;190(20):6881-93.
91. **Chen Y, Luo Y, Carleton H, Timme R, Melka D, Muruvanda T, et al.** Whole genome and core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analyses of *Listeria monocytogenes* associated with an outbreak linked to cheese, United States, 2013. *Appl Environ Microbiol.* **2017**.
92. **Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **2008**;61(2):273-81.
93. **Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al.** Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* **2008**;14(2):195-200.
94. **Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M.** Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(2):346-56.

95. **Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY.** *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clin Microbiol Rev. **2014**;27(3):543-74.
96. **Anfora AT, Haugen BJ, Roesch P, Redford P, Welch RA.** Roles of serine accumulation and catabolism in the colonization of the murine urinary tract by *Escherichia coli* CFT073. Infect Immun. **2007**;75(11):5298-304.
97. **Roesch PL, Redford P, Batchelet S, Moritz RL, Pellett S, Haugen BJ, et al.** Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. Mol Microbiol. **2003**;49(1):55-67.
98. **Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M.** High metabolic potential may contribute to the success of ST131 uropathogenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. **2012**;50(10):3202-7.
99. **Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DebRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al.** Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. Emerg Infect Dis. **2012**;18(4):598-607.
100. **Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al.** The epidemic of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. MBio. **2013**;4(6):e00377-13.
101. **Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al.** Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. MBio. **2016**;7(2):e00347-16.
102. **Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL.** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. **2001**;183(1):78-88.
103. **Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al.** High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. **2012**;78(5):1353-60.
104. **Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al.** Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. J Infect Dis. **2013**;207(6):919-28.
105. **Pietsch M, Eller C, Wendt C, Holfelder M, Falgenhauer L, Fruth A, et al.** Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. Vet Microbiol. **2017**;200:130-7.
106. **Banerjee R, Johnson JR.** A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. Antimicrob Agents Chemother. **2014**;58(9):4997-5004.
107. **Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ.** Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. Veterinary Microbiology. **2011**;153(1-2):99-108.
108. **Pitout JD, DeVinney R.** *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. F1000Res. **2017**;6.
109. **Novais A, Pires J, Ferreira H, Costa L, Montenegro C, Vuotto C, et al.** Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). Antimicrob Agents Chemother. **2012**;56(7):3973-6.

110. **Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L.** beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* **2007**;121(3-4):197-214.
111. **Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Saenz Y, Garcia M, et al.** Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**;47(6):2056-8.
112. **EFSA.** Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* **2011**;9(8):2322.
113. **Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, et al.** Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol.* **2013**;79(16):4815-20.
114. **Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U.** Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **2013**;126(3-4):175-80.
115. **Schmid A, Hormansdorfer S, Messelhausser U, Kasbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol.* **2013**;79(9):3027-32.
116. **Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, et al.** High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(11):2631-4.
117. **Cohen Stuart J, van den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Hall ML.** Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int J Food Microbiol.* **2012**;154(3):212-4.
118. **Egea P, Lopez-Cerero L, Torres E, Gomez-Sanchez Mdel C, Serrano L, Navarro Sanchez-Ortiz MD, et al.** Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol.* **2012**;159(2):69-73.
119. **Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, et al.** Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol.* **2014**;304(7):805-16.
120. **Carmo LP, Nielsen LR, da Costa PM, Alban L.** Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infect Ecol Epidemiol.* **2014**;4.
121. **Fischer J, Irrgang A, Schmonger B, Guerra B, Kasbohrer A.** Occurrence of ESBL-, AmpC- and carbapenemase encoding genes in *E.coli* isolates from animal derived food products in Germany. 26th ECCMID Amsterdam: ESCMID; **2015**.
122. **Garcia-Cobos S, Kock R, Mellmann A, Frenzel J, Friedrich AW, Rossen JW.** Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC beta-Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. *PLoS One.* **2015**;10(7):e0134533.

123. **Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A.** Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist Updat.* **2013**;16(1-2):22-45.
124. **Schaufler K, Semmler T, Wieler LH, Wohrmann M, Baddam R, Ahmed N, et al.** Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410--another successful pandemic clone? *FEMS Microbiol Ecol.* **2016**;92(1).
125. **Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Ghosh H, Gwozdzinski K, Schmiedel J, Gentil K, et al.** Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. *Int J Antimicrob Agents.* **2016**;47(6):457-65.
126. **de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, et al.** Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet.* **2014**;10(12):e1004776.
127. **Andersson DI.** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol.* **2006**;9(5):461-5.
128. **Andersson DI, Hughes D.** Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* **2010**;8(4):260-71.
129. **Turner PE, Cooper VS, Lenski RE.** Tradeoff between Horizontal and Vertical Modes of Transmission in Bacterial Plasmids. *Evolution.* **1998**;52(2):315-29.
130. **Elena SF.** Evolutionary Consequences and Costs of Plasmid-Borne Resistance to Antibiotics. In: Hughes D, Andersson DI, editors. *Antibiotic Development and Resistance.* 1: Taylor & Francis; **2001**.
131. **Vogwill T, MacLean RC.** The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol Appl.* **2015**;8(3):284-95.
132. **Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, et al.** The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* **1997**;24 Suppl 1:S9-16.
133. **Levin BR.** Models for the spread of resistant pathogens. *Neth J Med.* **2002**;60(7 Suppl):58-64; discussion -6.
134. **Sundqvist M.** Reversibility of antibiotic resistance. *Ups J Med Sci.* **2014**;119(2):142-8.
135. **Heinemann JA, Ankenbauer RG, Amabile-Cuevas CF.** Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discov Today.* **2000**;5(5):195-204.
136. **Dahlberg C, Chao L.** Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics.* **2003**;165(4):1641-9.
137. **Starikova I, Al-Haroni M, Werner G, Roberts AP, Sorum V, Nielsen KM, et al.** Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(12):2755-65.
138. **Eller C.** Molekulare Untersuchungen zu Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamase (ESBL)-bildenden Enterobacteriaceae als Besiedler und Infektionserreger des Menschen [Dissertation]. Robert Koch-Institut: Technische Universität Braunschweig; **2014**.

139. **Leistner R, Meyer E, Gastmeier P, Pfeifer Y, Eller C, Dem P, et al.** Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Escherichia coli*. an exploratory case-control study. *PLoS One*. **2013**;8(9):e74323.
140. **Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, et al.** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. **2009**;63(6):1135-41.
141. **Von Salviati C, Friese A, Roschanski N, Laube H, Guerra B, Kasbohrer A, et al.** Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. **2014**;127(9-10):412-9.
142. **Nelson EC, Elisha BG.** Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1999**;43(4):957-9.
143. **Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS.** *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother*. **2003**;47(1):395-7.
144. **Perez-Perez FJ, Hanson ND.** Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. **2002**;40(6):2153-62.
145. **Grobner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, et al.** Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J Med Microbiol*. **2009**;58(Pt 7):912-22.
146. **Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, et al.** Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *J Clin Microbiol*. **2014**;52(5):1358-65.
147. **Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. **2016**;16(2):161-8.
148. **Coil D, Jospin G, Darling AE.** A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*. **2015**;31(4):587-9.
149. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. **1990**;215(3):403-10.
150. **Li H, Durbin R.** Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. **2010**;26(5):589-95.
151. **Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA.** Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. **2011**;27(7):1009-10.
152. **Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M.** ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*. **2006**;34(Database issue):D32-6.
153. **Letunic I, Bork P.** Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res*. **2016**;44(W1):W242-5.

- 
154. **Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT.** Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **2004**;14(7):1394-403.
155. **Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al.** Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* **2012**;50(4):1355-61.
156. **Dong X, Stothard P, Forsythe IJ, Wishart DS.** PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res.* **2004**;32(Web Server issue):W660-4.
157. **Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al.** In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* **2014**;58(7):3895-903.
158. **Rozen S, Skaletsky H.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* **2000**;132:365-86.
159. **Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al.** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* **2008**;9:75.
160. **Stamatakis A.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* **2014**;30(9):1312-3.
161. **Becker L, Fuchs S, Pfeifer Y, Semmler T, Eckmanns T, Korr G, et al.** Whole Genome Sequence Analysis of CTX-M-15 Producing *Klebsiella* Isolates Allowed Dissecting a Polyclonal Outbreak Scenario. *Front Microbiol.* **2018**;9:322.
162. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al.** Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(11):2640-4.
163. **Li H.** A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* **2011**;27(21):2987-93.
164. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* **2014**;30(15):2114-20.
165. **Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al.** VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* **2012**;22(3):568-76.
166. **Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al.** Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **2014**;52(5):1501-10.
167. **Hille K, Ruddat I, Schmid A, Hering J, Hartmann M, von Munchhausen C, et al.** Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms-Joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. *Prev Vet Med.* **2017**;142:39-45.
168. **Hering J, Fromke C, von Munchhausen C, Hartmann M, Schneider B, Friese A, et al.** Cefotaxime-resistant *Escherichia coli* in broiler farms-A cross-sectional investigation in Germany. *Prev Vet Med.* **2016**;125:154-7.

169. **Hering J, Hille K, Fromke C, von Munchhausen C, Hartmann M, Schneider B, et al.** Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms--a cross-sectional study. *Prev Vet Med.* **2014**;116(1-2):129-37.
170. **Wallmann J, Schroter K, Wieler LH, Kroker R.** National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *Int J Antimicrob Agents.* **2003**;22(4):420-8.
171. **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* **1995**;226(2):235-40.
172. **Sambrook J, Fritsch EF.** Molecular cloning. New York: Cold spring harbor laboratory press; **1989**.
173. **Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T.** Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* **1997**;35(10):2546-50.
174. **Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM.** A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid.* **1978**;1(3):417-20.
175. **Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al.** SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* **2012**;19(5):455-77.
176. **Halbedel S, Prager R, Fuchs S, Trost E, Werner G, Flieger A.** Whole genome sequencing of recent *Listeria monocytogenes* isolates from Germany reveals population structure and disease clusters. *J Clin Microbiol.* **2018**.
177. **Roer L, Tchesnokova V, Allesoe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al.** Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on *fimH* Alleles. *J Clin Microbiol.* **2017**;55(8):2538-43.
178. **Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F, et al.** Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(10):3736-42.
179. **Gordienko EN, Kazanov MD, Gelfand MS.** Evolution of pan-genomes of *Escherichia coli*, *Shigella* spp., and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* **2013**;195(12):2786-92.
180. **Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW.** Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol.* **2010**;60(4):708-20.
181. **Komano T.** Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet.* **1999**;33:171-91.
182. **Seiffert SN, Carattoli A, Schwendener S, Collaud A, Endimiani A, Perreten V.** Plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2/4</sub> in *Escherichia coli* from poultry, poultry meat, and humans belong to a novel IncK subgroup designated IncK2. *Front Microbiol.* **2017**;8:407.
183. **Verdet C, Gautier V, Chachaty E, Ronco E, Hidri N, Decre D, et al.** Genetic context of plasmid-carried *bla*<sub>CMY-2</sub>-like genes in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(9):4002-6.



184. **Fang LX, Sun J, Li L, Deng H, Huang T, Yang QE, et al.** Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. *Int J Antimicrob Agents*. **2015**;46(2):209-13.
185. **Both A, Huang J, Kaase M, Hezel J, Wertheimer D, Fenner I, et al.** First report of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and OXA-232. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2016**;86(4):437-8.
186. **Hansen KH, Bortolaia V, Nielsen CA, Nielsen JB, Schonning K, Agero Y, et al.** Host-specific patterns of genetic diversity among Inc11-Igama and IncK plasmids encoding CMY-2 beta-lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry, and dogs in Denmark. *Appl Environ Microbiol*. **2016**;82(15):4705-14.
187. **Mo SS, Norstrom M, Sletteameas JS, Lovland A, Urdahl AM, Sunde M.** Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Vet Microbiol*. **2014**;171(3-4):315-20.
188. **Mo SS, Sletteameas JS, Berg ES, Norstrom M, Sunde M.** Plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* resistant to extended-spectrum cephalosporins in the Norwegian broiler production. *PLoS One*. **2016**;11(4):e0154019.
189. **Roer L, Hansen F, Thomsen MCF, Knudsen JD, Hansen DS, Wang M, et al.** WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *J Antimicrob Chemother*. **2017**;72(7):1922-9.
190. **Nuesch-Inderbinen MT, Baschera M, Zurfluh K, Hachler H, Nuesch H, Stephan R.** Clonal Diversity, Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Causing Community Acquired Urinary Tract Infection in Switzerland. *Front Microbiol*. **2017**;8:2334.
191. **Brolund A, Edquist PJ, Makitalo B, Olsson-Liljequist B, Soderblom T, Wisell KT, et al.** Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clin Microbiol Infect*. **2014**;20(6):O344-52.
192. **Li B, Sun JY, Liu QZ, Han LZ, Huang XH, Ni YX.** High prevalence of CTX-M beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China. *Scand J Infect Dis*. **2011**;43(3):170-4.
193. **Nicolas-Chanoine MH, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, et al.** 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother*. **2013**;68(3):562-8.
194. **Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr Infect Dis J*. **2013**;32(5):543-8.
195. **Arvand M, Moser V, Pfeifer Y.** Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. *J Antimicrob Chemother*. **2013**;68(11):2686-8.
196. **Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, et al.** Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. **2009**;64(3):635-41.

197. **Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, et al.** Clonal structure, extended-spectrum beta-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**;57(1):309-16.
198. **Wu G, Day MJ, Mafura MT, Nunez-Garcia J, Fenner JJ, Sharma M, et al.** Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. *PLoS One.* **2013**;8(9):e75392.
199. **Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M.** *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* **2010**;51(3):286-94.
200. **Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD.** Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* **2011**;17(7):1039-43.
201. **Johnson JR, Stell AL.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* **2000**;181(1):261-72.
202. **Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Perez-Vazquez M, et al.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents.* **2009**;34(2):173-6.
203. **Hansen F, Olsen SS, Heltberg O, Justesen US, Fuglsang-Damgaard D, Knudsen JD, et al.** Characterization of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Microb Drug Resist.* **2014**;20(4):316-24.
204. **Hordijk J, Mevius DJ, Kant A, Bos ME, Graveland H, Bosman AB, et al.** Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(11):2468-76.
205. **Schink AK, Kadlec K, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S.** Analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(8):1741-9.
206. **Guerra B, Fischer J, Rodriguez C, Eller C, Helmuth R, Pfeifer Y.** Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamasen (ESBL) und AmpC  $\beta$ -Laktamasen in Enterobacteriaceae bei Tier, Lebensmitteln und Mensch. BfR-Symposium "Zoonosen und Lebensmittelsicherheit"; Berlin**2012**.
207. **Manges AR.** *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin Microbiol Infect.* **2016**;22(2):122-9.
208. **Turton JF, Doumith M, Hopkins KL, Perry C, Meunier D, Woodford N.** Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J Med Microbiol.* **2016**;65(6):538-46.
209. **Poirel L, Bernabeu S, Fortineau N, Podglajen I, Lawrence C, Nordmann P.** Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(10):4937-8.

- 
210. **Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y.** Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* **2009**;63(1):72-9.
211. **Peng C, Zong Z.** Sequence type 38 *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. *J Med Microbiol.* **2011**;60(Pt 5):694-5.
212. **Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD.** Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol.* **2012**;50(2):294-9.
213. **Bonnedahl J, Hernandez J, Stedt J, Waldenstrom J, Olsen B, Drobni M.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Gulls, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis.* **2014**;20(5):897-9.
214. **Guenther S, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Wieler LH, Schaufler K.** Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. *J Antimicrob Chemother.* **2017**;72(5):1310-3.
215. **Agerso Y, Jensen JD, Hasman H, Pedersen K.** Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis.* **2014**;11(9):740-6.
216. **Riley LW.** Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* **2014**;20(5):380-90.
217. **Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW.** Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med.* **2001**;345(14):1007-13.
218. **Pitout JD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **2008**;8(3):159-66.
219. **Sharp H, Valentin L, Fischer J, Guerra B, Appel B, Kasbohrer A.** Estimation of the transfer of ESBL-producing *Escherichia coli* to humans in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **2014**;127(11-12):464-77.
220. **EFSA.** Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* **2011**;9(8).
221. **Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, Feihl S, Gastmeier P, Gebhardt F, et al.** Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother.* **2016**;71(10):2957-63.
222. **Berg ES, Wester AL, Ahrenfeldt J, Mo SS, Slettemeas JS, Steinbakk M, et al.** Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and IncK/*bla*<sub>CMY-2</sub> resistance plasmids. *Clin Microbiol Infect.* **2017**.
223. **Reeves PR, Liu B, Zhou Z, Li D, Guo D, Ren Y, et al.** Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS One.* **2011**;6(10):e26907.

224. **Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, et al.** Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2012**;109(8):3065-70.
225. **Parsons BD, Zelyas N, Berenger BM, Chui L.** Detection, characterization, and typing of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. **2016**;7:478.
226. **Holmes A, Allison L, Ward M, Dallman TJ, Clark R, Fawkes A, et al.** Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* O157 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *J Clin Microbiol*. **2015**;53(11):3565-73.
227. **Projahn M, Daehre K, Roesler U, Friese A.** Extended-spectrum-beta-lactamase- and plasmid-encoded cephamycinase-producing Enterobacteria in the broiler hatchery as a potential mode of pseudo-vertical transmission. *Appl Environ Microbiol*. **2017**;83(1).
228. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. **2007**;59(2):165-74.
229. **Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, et al.** The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One*. **2012**;7(9):e46547.
230. **Oteo J, Cercenado E, Cuevas O, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, et al.** AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2010**;67(3):270-6.
231. **Sidjabat HE, Seah KY, Coleman L, Sartor A, Derrington P, Heney C, et al.** Expansive spread of IncI1 plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> amongst *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. **2014**;44(3):203-8.
232. **Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A.** Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect*. **2010**;16(2):171-8.
233. **Dame-Korevaar A, Fischer EAJ, Stegeman A, Mevius D, van Essen-Zandbergen A, Velkers F, et al.** Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. *Vet Microbiol*. **2017**;203:211-4.
234. **Huddleston JR.** Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*. **2014**;7:167-76.
235. **Karczmarczyk M, Wang J, Leonard N, Fanning S.** Complete nucleotide sequence of a conjugative IncF plasmid from an *Escherichia coli* isolate of equine origin containing *bla*<sub>CMY-2</sub> within a novel genetic context. *FEMS Microbiol Lett*. **2014**;352(1):123-7.
236. **Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Schapendonk C, van den Munckhof T, Leverstein-van Hall MA, et al.** Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*. **2013**;167(3):359-62.
237. **Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadr HR, Letellier A, Abraham S, Trott DJ, et al.** Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *Int J Antimicrob Agents*. **2016**;48(2):194-202.

238. **Jamborova I, Dolejska M, Zurek L, Townsend AK, Clark AB, Ellis JC, et al.** Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environ Microbiol.* **2017**;19(5):2025-36.
239. **Bortolaia V, Hansen KH, Nielsen CA, Fritsche TR, Guardabassi L.** High diversity of plasmids harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *J Antimicrob Chemother.* **2014**;69(6):1492-6.
240. **Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T.** Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* **2013**;10(3):243-9.
241. **Guo YF, Zhang WH, Ren SQ, Yang L, Lu DH, Zeng ZL, et al.** IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One.* **2014**;9(5):e96738.
242. **Deng H, Si HB, Zeng SY, Sun J, Fang LX, Yang RS, et al.** Prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in a farrowing farm: ST1121 clone harboring IncHI2 plasmid contributes to the dissemination of *bla*<sub>CMY-2</sub>. *Front Microbiol.* **2015**;6:1210.
243. **Guynet C, de la Cruz F.** Plasmid segregation without partition. *Mob Genet Elements.* **2011**;1(3):236-41.
244. **Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D.** Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(1):60-7.
245. **Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al.** Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* **2011**;17(6):873-80.
246. **Wang J, Stephan R, Power K, Yan Q, Hachler H, Fanning S.** Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans. *J Antimicrob Chemother.* **2014**;69(10):2658-68.
247. **da Silva KC, Cunha MP, Cerdeira L, de Oliveira MG, de Oliveira MC, Gomes CR, et al.** High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2017**;87(1):64-7.
248. **Fricke WF, McDermott PF, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, et al.** Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol.* **2009**;75(18):5963-71.
249. **Mataseje LF, Baudry PJ, Zhanel GG, Morck DW, Read RR, Louie M, et al.** Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2010**;67(4):387-91.
250. **Accogli M, Fortini D, Giufre M, Graziani C, Dolejska M, Carattoli A, et al.** IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. *Clin Microbiol Infect.* **2013**;19(5):E238-40.

251. **Barlow M, Hall BG.** Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(5):1190-8.
252. **Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, et al.** Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(9):4114-21.
253. **Mac Aogain M, Rogers TR, Crowley B.** Identification of emergent *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. *New Microbes New Infect.* **2016**;9:58-62.
254. **Cullik A.** Genetische Hintergründe für die Verbreitung der Extended-Spektrum Beta-Laktamase Gene *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli* [Dissertation]. Optimus Verlag: Universität Braunschweig; **2010**.
255. **Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, et al.** Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**;50(9):3212-5.
256. **Poirel L, Decousser JW, Nordmann P.** Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub> beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**;47(9):2938-45.
257. **Yassine H, Bientz L, Cros J, Goret J, Bebear C, Quentin C, et al.** Experimental evidence for *IS1294b*-mediated transposition of the *bla*<sub>CMY-2</sub> cephalosporinase gene in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* **2015**;70(3):697-700.
258. **Cassier P, Lallechere S, Aho S, Astruc K, Neuwirth C, Piroth L, et al.** Cephalosporin and fluoroquinolone combinations are highly associated with CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: a case-control study in a French teaching hospital. *Clin Microbiol Infect.* **2011**;17(11):1746-51.
259. **Borjesson S, Guillard T, Landen A, Bengtsson B, Nilsson O.** Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals. *Vet Microbiol.* **2016**;194:74-8.
260. **Mammeri H, Guillon H, Eb F, Nordmann P.** Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(11):4556-60.
261. **Roschanski N, Fischer J, Falgenhauer L, Pietsch M, Guenther S, Kreienbrock L, et al.** Retrospective Analysis of Bacterial Cultures Sampled in German Chicken-Fattening Farms During the Years 2011-2012 Revealed Additional VIM-1 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and a Serologically Rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Front Microbiol.* **2018**;9:538.
262. **Kurpiel PM, Hanson ND.** Point mutations in the *inc* antisense RNA gene are associated with increased plasmid copy number, expression of *bla*<sub>CMY-2</sub> and resistance to piperacillin/tazobactam in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(2):339-45.
263. **Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, et al.** Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. *PLoS One.* **2016**;11(7):e0159863.

264. **Arvand M, Bettge-Weller G, Fruth A, Uphoff H, Pfeifer Y.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (stx1)-positive *Escherichia coli* O91:H14 carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on an IncI1-ST31 plasmid isolated from a human patient in Germany. *Int J Med Microbiol.* **2015**;305(3):404-7.
265. **Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM.** Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol.* **2006**;72(6):3940-8.
266. **Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI.** Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio.* **2014**;5(5):e01918-14.
267. **Dionisio F, Conceicao IC, Marques AC, Fernandes L, Gordo I.** The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol Lett.* **2005**;1(2):250-2.
268. **Lenski RE.** Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Int Microbiol.* **1998**;1(4):265-70.
269. **Smith MA, Bidochka MJ.** Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can J Microbiol.* **1998**;44(4):351-5.
270. **Baker KS, Burnett E, McGregor H, Deheer-Graham A, Boinett C, Langridge GC, et al.** The Murray collection of pre-antibiotic era Enterobacteriaceae: a unique research resource. *Genome Med.* **2015**;7:97.
271. **Hansen AM, Qiu Y, Yeh N, Blattner FR, Durfee T, Jin DJ.** SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **2005**;56(3):719-34.
272. **Williams MD, Ouyang TX, Flickinger MC.** Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol Microbiol.* **1994**;11(6):1029-43.
273. **Merrell DS, Camilli A.** Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology.* **2002**;5(1):51-5.
274. **Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G.** A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell.* **1997**;90(1):43-53.
275. **Kovarik A, Matzke MA, Matzke AJ, Koulakova B.** Transposition of IS10 from the host *Escherichia coli* genome to a plasmid may lead to cloning artefacts. *Mol Genet Genomics.* **2001**;266(2):216-22.
276. **Yi H, Cho YJ, Yong D, Chun J.** Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies. *J Bacteriol.* **2012**;194(14):3742-3.
277. **Mahillon J, Chandler M.** Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**;62(3):725-74.
278. **Roberts D, Hoopes BC, McClure WR, Kleckner N.** IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell.* **1985**;43(1):117-30.
279. **Simons RW, Kleckner N.** Translational control of IS10 transposition. *Cell.* **1983**;34(2):683-91.
280. **Sawyer SA, Dykhuizen DE, DuBose RF, Green L, Mutangadura-Mhlanga T, Wolczyk DF, et al.** Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics.* **1987**;115(1):51-63.

281. **Matsutani S.** Multiple copies of IS10 in the *Enterobacter cloacae* MD36 chromosome. *J Bacteriol.* **1991**;173(24):7802-9.
282. **Stoebel DM, Dorman CJ.** The effect of mobile element IS10 on experimental regulatory evolution in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* **2010**;27(9):2105-12.
283. **Good BH, McDonald MJ, Barrick JE, Lenski RE, Desai MM.** The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations. *Nature.* **2017**;551(7678):45-50.
284. **Heuer H, Fox RE, Top EM.** Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad-host-range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host. *FEMS Microbiol Ecol.* **2007**;59(3):738-48.
285. **Loftie-Eaton W, Yano H, Burleigh S, Simmons RS, Hughes JM, Rogers LM, et al.** Evolutionary Paths That Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance. *Mol Biol Evol.* **2016**;33(4):885-97.
286. **De Gelder L, Williams JJ, Ponciano JM, Sota M, Top EM.** Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics.* **2008**;178(4):2179-90.
287. **Bouma JE, Lenski RE.** Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature.* **1988**;335(6188):351-2.
288. **San Millan A, Toll-Riera M, Qi Q, MacLean RC.** Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun.* **2015**;6:6845.
289. **Harrison E, Guymer D, Spiers AJ, Paterson S, Brockhurst MA.** Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum. *Curr Biol.* **2015**;25(15):2034-9.



## 8 ANHANG

**Abbildung A-1: Befüllungsschema der MHK-Mikrotiterplatte.** Konzentrationen in mg/l; AMP = Ampicillin, MEZ = Mezlocillin, MSU = Mezlocillin/Sulbactam (0,8 µg/l), CTM = Cefotiam, CTX = Cefotaxim, CAZ = Ceftazidim, FOX = Ceftoxitin, GEN = Gentamycin, KAN = Kanamycin, AMK = Amikacin, STR = Streptomycin, NAL = Nalidixinsäure, CMP = Chloramphenicol, OTE = Oxytetracyclin, CIP = Ciprofloxacin, MEP = Meropenem, SXT = Sulfameracin-Trimethoprim, WK = Wachstumskontrolle

	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	FOX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	
	16	32	32	8	16	32	32	8	32	32	64	32	
	8	16	16	4	8	16	16	4	16	16	32	16	
	4	8	8	2	4	8	8	2	8	8	16	8	
	2	4	4	1	2	4	4	1	4	4	9	4	
	1	2	2	0,5	1	2	2	0,5	2	2	4	WK	
CMP	4	8	16	32	0,063	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	MEP
OTE	0,5	1	2	4	8	X	4	8	16	32	64	128	SXT
CIP	0,063	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	WK	

### Anhang I: ESBL *E. coli* Populationsstudie

**Tabelle A-1: Studienisolate der ESBL *E. coli* Populationsstudie**

Isolat	Quelle	Phylogenetische Gruppe	ESBLTyp	TEM	ST	Typisierverfahren	rfbO25b PCR	Serotyp
1088/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-744	NGS, Miseq		
1090/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-1114	NGS, Miseq		
1091/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-2624	NGS, Miseq		
1092/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-227	NGS, Miseq		
1093/14	Normalbevölkerung	B1	CTX-M-14		ST-2178	NGS, Miseq		
1094/14	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	NGS, Miseq		
1095/14	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	NGS, Miseq		
1096/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-5017	NGS, Miseq		
1097/14	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-10	NGS, Miseq		
10-0021207-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-14		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR positiv	
10-0079569-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-69	Sanger		
10-0129217-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
10-0162477-008-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
11-0076945-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-14		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR negativ	O16
11-0081484-001-01	Normalbevölkerung	A	CTX-M-14		ST-410	Sanger		
11-0101398-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-117	Sanger		
11-0101398-002-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-117	Sanger		
11-0121047-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
11-0121067-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
12-0089857-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-117	Sanger		
12-0109439-001-02	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
12-0125769-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
12-0138215-002-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
12-0138215-005-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
12-0148911-001-01	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
10-0071810-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0077657-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0077661-004-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0105882-003-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0112999-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0123025-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+	
10-0129970-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	

## Anhang

Isolat	Quelle	Phylogenetische		ESBLTyp	TEM	ST	Typisierverfahren	rfbO25b PCR	Serotyp
		Gruppe							
10-0158422-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0158444-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0158459-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0166255-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0166932-017-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0169287-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0169290-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
10-0169298-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-3		ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0000102-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0032057-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0041914-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0045326-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-3		ST-131	PCR: rfbO	+		O25
11-0049113-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0109113-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-1	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
11-0127844-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-14		ST-131	PCR: rfbO	+		Orough
11-0145350-003-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-3	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		O25
11-0157069-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
12-0056072-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		
12-0094074-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-3	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		O25
12-0125770-001-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15	TEM-1	ST-131	PCR: rfbO	+		O25
12-0148904-003-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+		
12-0148904-007-01	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS002	stationär	B2	CTX-M-1		ST-141	Sanger			
RS004	stationär	B2	CTX-M-1		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS005	stationär	D	CTX-M-15		ST-354	GATC/PCR			
RS007	ambulant	B2	CTX-M-1		ST-12	Sanger			
RS012	ambulant	D	CTX-M-15		ST-648	GATC/PCR			
RS013	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS014	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS015	stationär	A	CTX-M-15		ST-48	GATC/PCR			
RS016	stationär	A	CTX-M-15		ST-361	GATC/PCR			
RS017	stationär	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv		SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS020	stationär	A	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR			
RS022	stationär	B2	CTX-M-1		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv		
RS023	stationär	B2	CTX-M-1		ST-1266	Sanger			
RS025	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS027	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS028	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS029	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS031	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS032	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS034	case control	A	CTX-M-15		ST-617	GATC/PCR			
RS039	case control	A	CTX-M-1		ST-46	Sanger			
RS043	case control	B2	CTX-M-1		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS044	case control	B2	CTX-M-1		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR negativ		O16 SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS045	case control	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv		
RS046	case control	D	CTX-M-1		ST-363	GATC/PCR			
RS048	case control	B2	CTX-M-1		ST-73	Sanger			
RS050	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS054	case control	D	CTX-M-1		ST-393	GATC/PCR			
RS055	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS057	case control	A	CTX-M-1		ST-93	Sanger			
RS058	case control	B2	CTX-M-15		ST-372	Sanger			
RS060	case control	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv		SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS061	case control	D	CTX-M-14		ST-624	Sanger			
RS062	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS063	case control	B2	CTX-M-15		ST-372	Sanger			
RS068	stationär	D	CTX-M-1		ST-106	GATC/PCR			
RS070	ambulant	A	CTX-M-15		ST-3171	GATC/PCR			
RS071	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS072	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS073	stationär	A	CTX-M-1		ST-93	Sanger			
RS074	stationär	A	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR			
RS075	stationär	B2	CTX-M-1		ST-219	NGS, Miseq			
RS077	ambulant	A	CTX-M-1		ST-10	Sanger			
RS079	ambulant	A	CTX-M-15		ST-1284	GATC/PCR			
RS080	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS082	ambulant	D	CTX-M-1		ST5129	GATC/PCR			
RS083	stationär	A	CTX-M-1		ST-10	Sanger			
RS084	stationär	B2	CTX-M-15		ST-95	Sanger			
RS085	stationär	D	CTX-M-1		ST-1011	GATC/PCR			
RS087	stationär	B2	CTX-M-1		ST-141	Sanger			
RS088	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+		
RS089	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR positiv		O25:H4

Isolat	Quelle	Phylogenetische		TEM	ST	Typisierverfahren	rfbO25b PCR	Serotyp
		Gruppe	ESBLTyp					
RS090	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1) SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS092	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS093	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS095	stationär	B2	CTX-M-1		ST-10	Sanger		
RS098	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS099	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv	SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1) SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS100	ambulant	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv	
RS101	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS102	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS103	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS104	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS105	stationär	D	CTX-M-14		ST-111	NGS, Miseq		
RS106	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS107	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS108	stationär	A	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR		
RS111	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS113	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS114	stationär	A	CTX-M-15		ST-617	GATC/PCR		
RS115	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS116	ambulant	A	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR		
RS118	stationär	D	CTX-M-1		ST-68	GATC/PCR		
RS119	stationär	B2	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS121	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS122	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS123	stationär	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv	SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1) SeroTypeFinder: Ont:H5 (99,16%)
RS124	ambulant	D	CTX-M-14		ST-405	NGS, Miseq	rfbO25b PCR falsch-positiv	
RS127	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS129	ambulant	D	CTX-M-1		ST-545	GATC/PCR		
RS130	ambulant	B1	CTX-M-1		ST5130	GATC/PCR		
RS134	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS135	stationär	B2	CTX-M-15		ST-410	Sanger		
RS137	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS139	ambulant	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR negativ	SeroTypeFinder: O102:Hnt
RS141	stationär	B2	CTX-M-15		ST-10	Sanger		
RS142	stationär	A	CTX-M-1		ST-10	NGS, Miseq	rfbO25b PCR falsch-positiv	O25:H4
RS143	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS144	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS146	ambulant	B1	CTX-M-1		ST-1431	GATC/PCR		
RS147	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS149	stationär	B1	CTX-M-15		ST-443	NGS, Miseq		
RS150	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS152	stationär	D	CTX-M-1		ST-393	GATC/PCR		
RS153	stationär	B1	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS154	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS155	stationär	D	CTX-M-1		ST-69	NGS, Miseq		
RS156	stationär	A	CTX-M-15		ST-361	NGS, Miseq		
RS158	ambulant	D	CTX-M-15		ST-648	NGS, Miseq		
RS159	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS160	ambulant	A	CTX-M-15		ST-1397	GATC/PCR		
RS162	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS165	stationär	B2	CTX-M-14		ST-73	NGS, Miseq		
RS166	stationär	B1	CTX-M-1		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS167	stationär	B1	CTX-M-1		ST-1126	GATC/PCR		
RS168	stationär	B1	CTX-M-1		ST-101	GATC/PCR		
RS169	stationär	B1	CTX-M-1		ST-540	GATC/PCR		
RS172	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS175	stationär	B1	CTX-M-1		ST-10	GATC/PCR		
RS176	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS179	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS180	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS181	ambulant	B1	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR		
RS182	ambulant	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS183	ambulant	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS184	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR negativ	Ont:Hnt
RS185	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS187	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS189	stationär	A	CTX-M-15		ST-410	GATC/PCR		
RS190	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS193	ambulant	B2	CTX-M-1		ST-1170	Sanger		
RS196	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS197	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	

Isolat	Quelle	Phylogenetische		TEM	ST	Typisierverfahren	rfbO25b PCR	Serotyp
		Gruppe	ESBLTyp					
RS198	stationär	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	+	SeroTypeFinder: O25b:H4 (Referenz KF277146.1)
RS199	stationär	B2	CTX-M-1		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS203	ambulant	B1	CTX-M-1		ST-155	GATC/PCR		
RS204	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR positiv	
RS208	case control	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
RS210	case control	B2	CTX-M-15		ST-361	Sanger		
RS211	case control	B1	CTX-M-1		ST-453	GATC/PCR		
RS215	case control	D	CTX-M-14		ST-405	NGS, Miseq		
RS216	case control	B1	CTX-M-14		ST-2079	NGS, Miseq		
RS217	case control	B2	CTX-M-1		ST-69	Sanger		
RS218	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS220	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS222	case control	B2	CTX-M-14		ST-1266	Sanger		
RS224	case control	A	CTX-M-15		ST-410	Sanger		
RS225	case control	B1	CTX-M-1		ST-1727	GATC/PCR		
RS226	case control	B1	CTX-M-1		ST-1464	GATC/PCR		
RS227	case control	B2	CTX-M-14		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR positiv	
RS228	case control	B1	CTX-M-14		ST-23	NGS, Miseq		
RS233	case control	A	CTX-M-15		ST-617	Sanger		
RS235	case control	B2	CTX-M-1		ST-88	Sanger		
RS236	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS238	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS239	case control	D	CTX-M-14		ST-405	Sanger		
RS240	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS242	case control	D	CTX-M-1		ST-1303	GATC/PCR		
RS243	case control	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS244	case control	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS246	case control	A	CTX-M-1		ST-48	Sanger		
RS247	case control	D	CTX-M-1		ST-1011	GATC/PCR		
RS248	case control	D	CTX-M-14		ST-38	NGS, Miseq		
RS250	case control	D	CTX-M-1		ST-363	NGS, Miseq		
RS252	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS254	case control	A	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS257	case control	B2	CTX-M-15		ST-131	Sanger	rfbO25b PCR negativ	Orough:H4
RS262	case control	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS263	case control	B2	CTX-M-1		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR negativ	O16
RS264	case control	B2	CTX-M-1		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR negativ	O16
RS265	case control	A	CTX-M-1		ST-10	Sanger		
RS271	stationär	A	CTX-M-15		ST-617	NGS, Miseq		
RS272	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS273	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS275	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS276	ambulant	A	CTX-M-1		ST-10	Sanger		
RS277	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS278	stationär	A	CTX-M-15		ST-617	Sanger		
RS280	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS281	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS282	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS283	stationär	B2	TEM-12		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS284	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS285	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS288	ambulant	A	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS290	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS295	ambulant	B2	CTX-M-14		ST-131	NGS, Miseq	rfbO25b PCR negativ	SeroTypeFinder: O16:H5
RS297	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS298	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS302	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS305	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS306	ambulant	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS307	ambulant	B2	CTX-M-55		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS313	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS314	ambulant	B2	CTX-M-14		ST-428	NGS, Miseq		
RS316	ambulant	D	CTX-M-14		ST-405	NGS, Miseq		
RS317	ambulant	D	CTX-M-14		ST-2003	NGS, Miseq		
RS318	ambulant	B1	CTX-M-1		ST-453	NGS, Miseq		
RS320	stationär	B2	CTX-M-27		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS321	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS323	stationär	A	CTX-M-1		ST-88	Sanger		
RS324	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS327	ambulant	B2	CTX-M-15		ST-141	Sanger		
RS328	ambulant	A	CTX-M-15		ST-410	Sanger		
RS333	Normalbevölkerung	A	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS334	Normalbevölkerung	A	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS341	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-4060	Sanger		
RS350	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-405	Sanger	rfbO25b PCR negativ	
RS351	Normalbevölkerung	B2	CTX-M-15		ST-34	Sanger		
RS355	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-394	Sanger		

Isolat	Quelle	Phylogenetische		TEM	ST	Typisierverfahren	rfbO25b PCR	Serotyp
		Gruppe	ESBLTyp					
RS361	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-69	Sanger		
RS362	stationär	B2	CTX-M-15		ST5128	Sanger		
RS367	stationär	A	CTX-M-14		ST-48	NGS, Miseq		
RS368	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS369	stationär	A	CTX-M-15		ST-361	Sanger		
RS370	stationär	B1	CTX-M-15		ST-101	GATC/PCR		
RS371	stationär	A	CTX-M-15		ST-410	NGS, Miseq		
RS376	Normalbevölkerung	A	CTX-M-1		ST-10	NGS, Miseq		
RS378	Normalbevölkerung	A	CTX-M-1		ST-10	NGS, Miseq		
RS379	Normalbevölkerung	A	CTX-M-1		ST-10	NGS, Miseq		
RS393	stationär	B2	CTX-M-15		ST-131	PCR: rfbO	+	
RS406	Normalbevölkerung	B1	CTX-M-1		ST-58	NGS, Miseq		
RS408	Normalbevölkerung	D	CTX-M-14		ST-38	Sanger		
RS418	Normalbevölkerung	D	CTX-M-1		ST-69	NGS, Miseq		

Anhang II: CMY-2 Studie

Tabelle A-2: Studienisolate der CMY-2 Studie

Isolat	Material	Isolationsjahr	Herkunft	Phylogenetisch e Gruppe	MLST	Replikon des <i>bla<sub>CMY</sub></i> Plasmids	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i> in kb (Inc Typ)	pMLST	Mapping <sup>1</sup>	Konjugation <sup>2</sup>	Zusätzliche Resistenzgene <sup>3</sup>	Resistenzen	Sequenzierort	Contigs	Mean Contig Length	% good targets (qGMST)	missing targets von 2547 (qGMST)
10-16	chicken	2012	TH	D	ST354	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	314	17.384	98,0	52
1034-14	human patient	2014	NW	B1	ST457	I1	90	pST12		CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX,	RKI	64	78.193	99,0	25
1035-14	human patient	2014	NW	D	ST453					negative		AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	155	32.885	98,9	28
1036-14	human patient	2014	NW	B1	ST1463	Chromosom <sup>5</sup>			FM246884	negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	88	57.642	99,4	16
1039-14	human patient	2014	NW	B2	ST141	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	200	26.341	99,1	24
1040-14	human patient	2014	NW	B2	ST355	Chromosom				negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	229	21.381	97,8	55
1041-14	human patient	2014	NW	A	ST110	K			KR005386.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, qnrB6, oac(6')-lb-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	187	26.318	98,8	30
1042-14	human patient	2014	NW	D	ST69	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	230	23.533	98,0	50
1043-14	human patient	2014	NW	B1	ST448	Chromosom <sup>5</sup>			FM246884	negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, qnrS1, oac(6')-lb-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	120	42.668	99,5	13
1044-14	human patient	2014	NW	A	ST23	I1		pST242		negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	302	16.871	98,1	48
1045-14	human patient	2014	NW	B2	ST131	I1	90	pST12		CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	102	52.129	98,8	28
1047-14	human patient	2014	NW	B1	ST453	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	326	15.396	98,9	27
110-12	human patient	2012	HE	B1	ST724	I1		pST43		negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	272	18.261	96,8	81
117-16	human patient	2016	NW	B2	ST131	I1		pST12	NC_011077	negative		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	57	90.117	99,0	25
124-16	human patient	2016	BE	D	ST963	Chromosom				negative		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	123	42.165	98,9	29
160-16	human patient	2016	BB	D	ST38	Chromosom				negative		AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	188	27.843	98,9	27
177-10	human patient	2010	BW	B2	ST131	na <sup>6</sup>				negative	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	73	70.740	98,9	27
216-16	human patient	2015	NW	D	ST38	Chromosom				negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	100	49.857	98,7	34
252-09	human patient	2009	NW	B1	ST86	I1		pST43		CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	97	51.434	98,9	29
304-13-1	human patient	2013	HE	A	ST10	I1	80, 60 (IncI1, IncFI) 140, 100, 55, 40 (IncI1, IncI/M, IncR, IncF)	pST240		CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, oac(6')-lb-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	251	20.135	98,8	30
349-14	human patient rectal swab colonisation	2011	BE	D	ST69	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-12</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	112	48.683	99,1	23
35-16	chicken gilets	2012	SN	D	ST420	K			KR005384.1	CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	657	8.195	91,1	226
36-16	chicken drumstick	2012	HE	D	ST69	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	382	14.307	98,5	37
37-16	food	2012	HE	D	ST38	K			KR005386.1	n.d.	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	520	10.737	97,9	54
372-13	human patient	2011	BY	D	ST115	K			KR005384.1	CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	300	18.580	98,5	37
38-16	chicken meat spiced	2012	HE	D	ST68	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	231	23.979	99,1	24
39-16	chicken schnitzel	2012	HE	D	ST117	I1		pST12		n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	211	26.248	99,1	23
393-08	human patient	2008	MV	D	ST354	I1	180, 100, 90, 75 (IncI1, IncFI) IncFI <sub>B</sub> , IncP, IncK, IncFIJ	pST26		CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-12</sub>, oac(6')-lb-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	118	46.621	97,8	56
399-15	human patient	2013	NW	B2	ST131	I1		pST12	NC_011077	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	61	85.774	97,4	65
40-16	chicken drumstick	2012	NI	D	ST57	K			KR005384.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	1.176	4.413	37,3	1597
41-16	chicken drumstick	2012	NI	D	ST57	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	235	23.879	98,6	35
42-16	chicken drumstick	2012	NI	D	ST57	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	279	20.343	98,8	30
43-16	chicken drumstick	2012	NI	D	ST57	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	379	15.232	98,7	34
44-16	chicken drumstick	2012	NI	B1	ST155	K	80, 110		KR005384.1	CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	238	21.940	99,4	16
449-08-1	human patient	2008	ST	A	ST2450	Chromosom <sup>5</sup>			FM246884	negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, oac(6')-lb-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	183	26.831	97,8	56
45-16	chicken drumstick	2012	NI	B1	ST155	K	80, 110		KR005384.1	CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	223	23.401	99,5	13
46-16	chicken drumstick	2012	NI	D	ST38	K			KR005386.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	406	13.292	98,1	48
463-16	chicken	2012	NI	D	ST38	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	196	29.506	98,9	28
464-16	chicken	2012	NI	B2	ST131	I1		pST12	NC_011077	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	61	84.255	98,9	27
465-16	chicken	2012	NI	A	ST540	I1			NC_011077	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	91	53.149	99,2	21
466-16 <sup>7</sup>	chicken	2012	NI	D	ST117	I1		pST12	CP012929.1	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	95	56.565	99,1	23
466-16 <sup>7</sup>	chicken	2012	NI	D	ST117	K	85		KR005384.1	CMY-2-transconjugant		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	95	56.565		
467-16	chicken	2012	NI	B2	ST131	I1		pST12	NC_011077	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	52	101.721	99,0	26
468-16	chicken	2012	NI	B2	ST131	I1		pST12	NC_011077	n.d.		AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	64	82.317	98,9	27
469-16	chicken	2011	NI	D	ST38	K			KR005386.1	negative	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	159	35.926	99,1	23
470-16	chicken	2011	NI	D	ST57	K			KR005384.1	CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	129	42.981	98,9	29
471-16	chicken	2011	NW	D	ST57	K			KR005384.1	n.d.	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	158	38.173	98,9	28
47-16	chicken drumstick	2012	NI	B1	ST58	I1		pST2	KT186369.1	CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	124	40.650	99,5	12
472-16	chicken	2011	NW	B1	ST1196	I1	33, 85, 110	pST241		CMY-2-transconjugant	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	385	14.297	99,5	14
473-14	human patient TS infection	2012	BE	D	ST117	K			KR005386.1	CMY-2-transconjugant	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	252	21.133	98,9	28

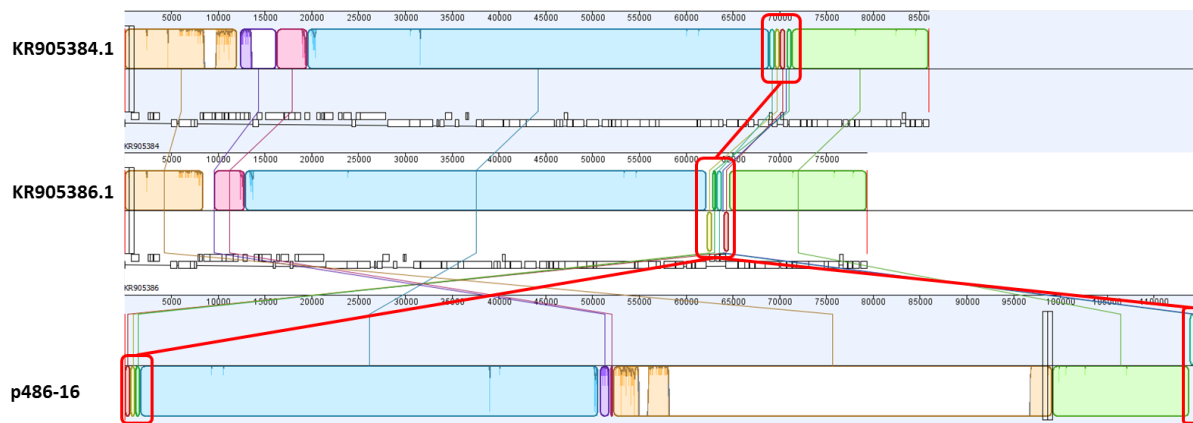
473-16	chicken	2011	NW	D	ST117	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	90	58.107	99.1	23
474-16	chicken	2011	NW	D	ST57	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	1.209	6.156	98.4	41
475-16	pig	2011	NW	B1	ST212	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	89	58.166	99.3	17
476-16	chicken	2012	ST	D	ST117	I1		KP012929.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	92	56.682	99.0	25
477-16	chicken	2012	ST	D	ST1158	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	148	38.048	98.7	34
478-16	chicken	2012	ST	B1	ST162	I1		pST36	negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	76	67.727	99.6	11
479-16	chicken	2012	ST	A	ST2040	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	99	51.976	99.4	16
480-16	chicken	2012	ST	A	ST2040	I1		NC_011077	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	109	47.371	99.3	18
481-14	human patient Blood culture	2013	BE	B2	ST127	K	80	KR905384.1	CMV-2-transconjugant		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	964	5.128	53.2	1193
481-16	chicken	2012	ST	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	129	42.469	99.1	22
48-16	chicken breast	2012	NI	D	ST350	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	188	31.140	99.3	19
482-16	chicken	2012	ST	A	ST10	I1		NC_011077	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	107	47.795	99.4	16
483-16	chicken	2012	ST	A	ST2040	I1		NC_011077	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	110	46.467	99.2	20
484-16	chicken	2011	BB	D	ST3778	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	127	41.440	99.0	26
485-16	chicken	2011	ST	D	ST3778	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	123	42.475	99.1	22
486-16	chicken	2011	BB	B2	ST429	K		p486-16	CMV-2-transconjugant			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	57	92.393	98.9	27
487-16	chicken	2012	MV	B1	ST155	I1		KT186369.1	negative			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	122	41.761	99.3	19
488-16	chicken	2012	BB	B2	ST429	K		p486-16	CMV-2-transconjugant			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	54	97.507	98.9	27
489-16	chicken	2012	BB	B2	ST420	K		KR905384.1	negative			AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	122	44.760	98.8	31
490-16	chicken	2012	BY	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	140	39.500	99.1	23
491-16	chicken	2012	BY	D	ST2309	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	332	18.408	98.6	36
49-16	pork belly	2012	BY	A	ST10	na <sup>6</sup>			negative		<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	2.017	4.107	87.8	310
492-16	chicken	2012	BY	D	ST2485	I1		KP012929.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	49	105.733	99.4	16
493-16	chicken	2012	BY	D	ST117	I1		KP012929.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	110	47.497	99.0	26
494-16	chicken	2012	BY	D	ST3778	I1		NC_011077	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	122	43.100	99.2	21
495-16	chicken	2012	BY	B2	ST131	I1		NC_011077	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	60	85.698	98.9	27
496-16	chicken	2012	BY	D	ST117	I1		KP012929.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	116	45.088	98.9	27
497-16	chicken	2012	BY	B2	ST131	I1		NC_011077	negative			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	61	88.344	99.1	24
498-16	chicken	2012	BY	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	127	43.831	99.1	24
499-16	chicken	2012	BY	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	135	41.305	99.1	23
500-16	turkey	2012	BY	B2	ST131	I1		NC_011077	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	58	86.637	98.9	27
501-16	turkey	2014	ST	B1	ST1196	Chromosom <sup>4</sup>		FM246884	negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	94	56.683	99.3	18
50-16	chicken breast	2013	SN	A	ST4937	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i> , <i>qmrB19</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	744	8.017	98.3	44
502-16	turkey	2014	ST	B1	ST1196	Chromosom <sup>4</sup>		FM246884	negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	98	54.370	99.3	18
503-16	turkey	2014	ST	B1	ST1196	Chromosom <sup>5</sup>		FM246884	negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	102	52.622	99.4	16
504-16	pig	2012	NI	A	ST2040	I1		NC_011077	n.d.		<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	112	46.601	98.9	27
505-16	pig	2012	NW	D	ST57	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	159	37.957	98.9	27
506-16	pig	2011	NW	B1	ST1196	Chromosom <sup>5</sup>			negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	92	56.381	99.5	14
507-16	pig	2011	NW	B1	ST1196	Chromosom <sup>5</sup>			negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	88	58.910	98.4	42
509-16	pig	2011	ST	B1	ST1196	Chromosom <sup>4</sup>			negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	87	59.662	99.3	17
510-16	pig	2011	BB	D	ST3778	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	129	40.813	99.0	25
511-16	pig	2011	BB	A	ST1594	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	181	30.655	99.3	17
51-16	carcass	2013	SN	A	ST2040	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-5</sub></i> , <i>qmrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	204	26.160	99.3	18
512-16	cattle	2012	NI	D	ST38	Chromosom <sup>5</sup>		FM246884	negative			AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	86	56.039	99.3	19
5-16	chicken	2011	NI	D	ST117	I1	100	NC_011077	CMV-2-transconjugant			AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	498	10.644	93.2	173
52-16	turkey breast	2013	SN	A	ST1421	I1		KP012929.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>qmrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	245	20.505	98.9	27
531-12	human patient	2012	NI	D	ST393	I1	85	NC_011077	CMV-2-transconjugant			AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RKI	809	6.437	91.0	230
53-16	pork meat raw	2013	NI	B1	ST75	I1		KT186369.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	243	22.025	99.4	16
590-14	human patient	2014	HE	B2	ST131	K		KR905384.1	n.d.		<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	54	92.557	99.0	25
6-16	pig	2011	NW	A	ST10	I1	95	KT186369.1	CMV-2-transconjugant		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	402	12.777	98.9	29
66-08	human patient	2008	HE	D	ST354	K		KR905384.1	CMV-2-transconjugant			AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	LGC	131	40.630	99.4	65
689-15	human patient	2013	BW	B1	ST58	I1	80		CMV-2-transconjugant		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	150	33.954	99.1	23
690-15	human patient	2013	Switze rland	D	ST69	Chromosom <sup>5</sup>		FM246884	negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	125	41.729	98.9	27
701-14	human patient catheter urine	2013	BE	D	ST59	K		KR905384.1	n.d.			AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	356	14.832	97.2	72
701-15	human patient	2014	HE	D	ST93	I1		NC_011077	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	95	54.870	99.2	20
7-16	chicken	2012	NI	D	ST3778	I1	100	NC_011077	CMV-2-transconjugant		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	393	13.427	98.7	33
721-15	human patient	2014	HE	B1	ST58	I1		KT186369.1	n.d.		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	111	46.316	99.4	15
739-12	human patient	2012	BY	A	ST69	Chromosom <sup>4</sup>			negative		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RKI	264	20.036	98.9	27

740-12	human patient	2012	BY	A	ST10	Chromosom <sup>5</sup>	170	FM246884	negative	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RK1	175	26.984	99,0	25
761-14	human patient	2008	NW	A	ST369	A/C		CP014658	CMV-2-transconjugant	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	73	67.688	99,2	20
763-14	human patient	2008	NW	D	ST362	K		KR905384.1	negative	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	75	71.395	99,3	18
765-14	human patient	2009	NW	B1	ST1844	I1		CP012929.1	CMV-2-transconjugant	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	71	72.154	99,3	18
767-14	human patient	2012	NW	A	ST694	K		KR905384.1	negative	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RK1	280	18.892	99,1	24
767-14	human patient	2012	NW	D	ST648	na <sup>6</sup>			negative	<i>bla</i> <sub>CTXM-15</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RK1	441	11.845	97,8	57
8-16	chicken	2012	BY	B2	ST744	K	115	p486-16	CMV-2-transconjugant	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RK1	287	18.328	98,6	36
83-16	human patient	2016	NW	A	ST749	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RK1	117	41.729	99,0	25
856-14	human patient (rectal swab (pneumonia))	2012	BB	B1	ST348	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RK1	142	34.778	99,5	13
86-16	human patient	2016	NW	B2	ST131	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RK1	78	66.960	98,9	29
90-16	human patient	2016	NW	D	ST38	Chromosom			negative	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	LGC	75	66.316	98,9	27
9-16	cattle	2014	NW	A	ST88	I1	95	pST55	CMV-2-transconjugant	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	RK1	321	17.055	98,7	32
RL101	chicken breast	2012	NI	D	ST117	I1		NC_011077	n.d.	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	227	23.355	99,1	24
RL103	chicken breast	2012	NI	A	ST752	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	272	20.258	99,3	18
RL104	chicken breast	2012	NI	A	ST2040	I1		NC_011077	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	220	23.543	99,3	17
RL105	chicken breast	2014	NI	A	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	433	12.577	99,0	26
RL106	chicken breast	2012	NI	B2	ST131	K		KR905384.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	248	22.464	98,9	27
RL107	chicken breast	2015	NI	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	348	16.184	99,1	24
RL108	chicken breast	2012	NI	D	ST117	I1		CP012929.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	162	32.272	99,1	24
RL111	chicken breast	2012	NI	D	ST69	K		KR905384.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	209	27.250	98,9	28
RL124	chicken breast	2012	NI	D	ST69	K		KR905384.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	331	16.542	98,3	36
RL132	chicken drumstick	2012	HE	D	ST117	I1		CP012929.1	n.d.	<i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	231	23.077	99,0	26
RL137	chicken meat	2012	HE	B1	ST569	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	101	50.776	99,0	25
RL225	chicken wings	2012	HE	B1	ST58	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	154	32.973	99,5	13
RL226	chicken drumstick	2012	HE	B1	ST58	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	132	38.108	99,5	12
RL229	chicken schnitzel	2012	HE	B2	ST131	I1		CP012929.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	162	34.092	98,9	28
RL272	chicken drumstick	2012	BY	D	ST69	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	93	58.966	99,1	22
RL273	turkey drumstick	2012	BY	A	ST6008	I1			n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	150	35.359	98,6	36
RL274	turkey schnitzel	2012	BY	B1	ST1463	Chromosom <sup>5</sup>		FM246884	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	BFR	117	43.972	99,4	16
RL276	chicken meat	2012	BY	D	ST108	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	89	59.557	98,9	28
RL281	chicken breast	2012	BY	D	ST57	I1		NC_011077	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	86	62.031	99,2	21
RL282	chicken drumstick	2012	BY	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	216	26.218	98,9	27
RL285	turkey breast	2012	BY	B1	ST5763	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	111	45.740	99,3	17
RL288	turkey schnitzel	2012	BY	D	ST117	I1		CP012929.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	95	54.308	99,0	25
RL297	chicken drumstick	2012	BY	A	ST10	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	296	19.162	99,0	26
RL302	chicken schnitzel	2012	BY	D	ST354	I1		ST354	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	BFR	159	34.268	98,5	39
RL304	chicken schnitzel	2012	BY	A	ST1286	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	152	33.616	98,9	29
RL305	chicken breast	2012	BY	D	ST117	I1		NC_011077	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	BFR	136	39.634	99,2	20
RL306	chicken schnitzel	2012	BY	A	ST2040	na <sup>6</sup>			n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	187	28.104	99,2	20
RL308	turkey schnitzel	2012	BY	A	ST10	A/C		CP014658	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	BFR	93	54.198	99,2	20
RL311	chicken meat raw	2012	BY	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	156	35.622	99,1	23
RL315	pork mincemeat	2012	BY	A	ST10	A/C		CP014658	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	156	32.777	99,0	25
RL316	chicken breast	2012	BY	B2	ST429	K		p486-16	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	74	71.923	98,9	28
RL318	chicken drumstick	2012	BY	D	ST68	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	144	38.428	99,0	26
RL320	chicken meat strips	2012	BY	B2	ST429	K		p486-16	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	87	61.173	98,9	29
RL401	turkey breast	2012	SN	A	ST2040	I1		CP012929.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-2</sub> , <i>qnrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	BFR	89	57.399	99,4	15
RL446	chicken meat	2013	NI	D	ST115	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-2</sub> , <i>qnrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	228	25.488	98,7	32
RL87	chicken breast	2012	NI	D	ST38	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-2</sub> , <i>qnrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	329	18.059	99,1	23
RL88	chicken breast	2012	NI	A	ST1818	I1		NC_011077	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-2</sub> , <i>qnrS1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	170	29.958	98,2	45
RL89	chicken breast	2012	NI	B1	ST58	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	110	46.205	99,5	13
RL91	chicken drumstick	2012	NI	B1	ST58	I1		KT186369.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	160	32.080	97,2	71
RL94	chicken drumstick	2012	NI	A	ST373	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	255	21.396	99,1	24
RL95	chicken drumstick	2012	NI	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	266	20.477	99,1	24
RL97	chicken drumstick	2012	NI	B2	ST429	K		p486-16	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	178	29.434	98,8	30
RL98	chicken breast	2012	NI	D	ST38	K		KR905386.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	272	20.013	99,1	24
RL99	chicken breast	2012	NI	A	ST1594	K		KR905384.1	n.d.	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>mcr-1</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX	BFR	421	18.705	98,7	32
RS131	human patient	2012	BW	A	ST10	A/C		CP014658	CMV-2-transconjugant	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	AMP, CTX, CAZ, FOX, CIP	RK1	276	12.710	99,2	21

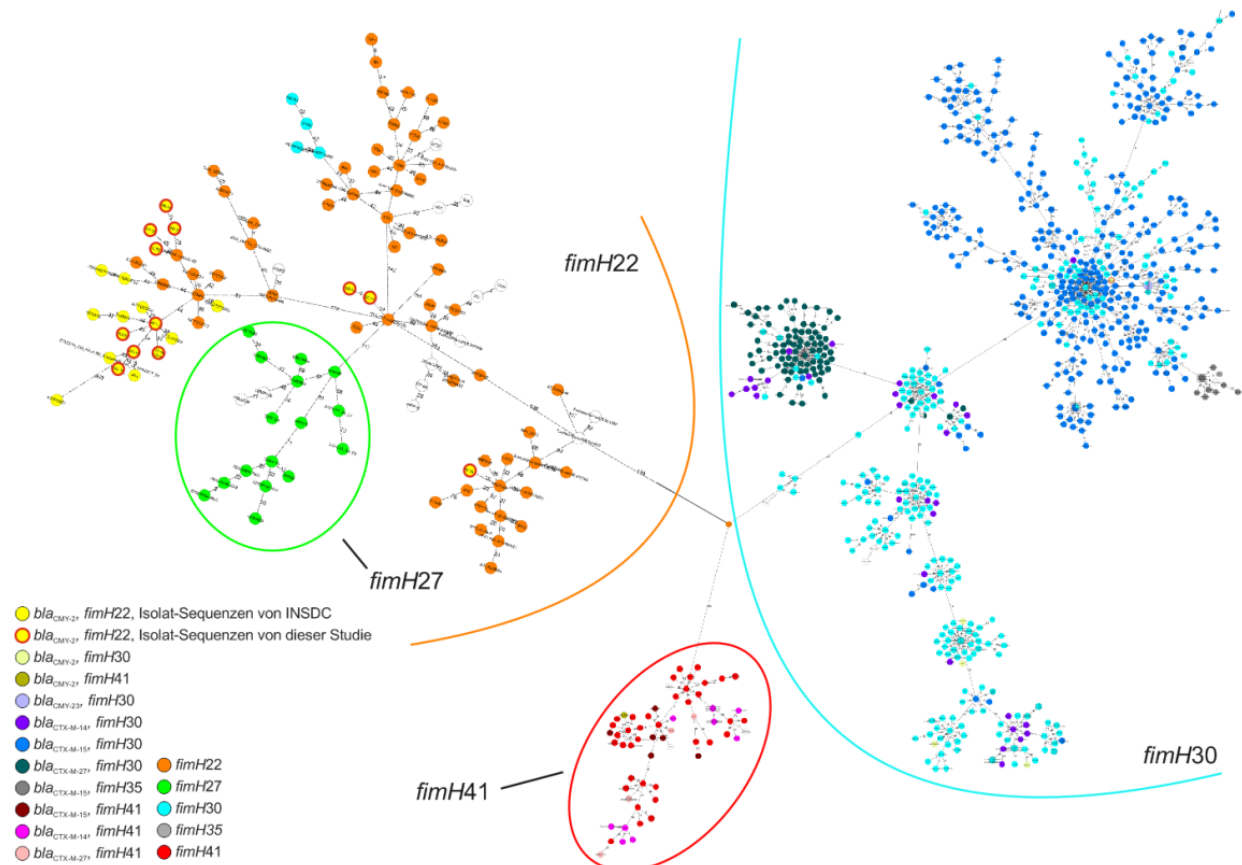
n.d.: nicht durchgeführt, <sup>1</sup>Referenzplasmid für Plasmidmapping, <sup>2</sup>Transfer der *bla*<sub>CMV-2</sub> Gene wurde mittels Konjugationsassay getestet (Selektion auf LB Agar mit Ampicillin (100mg/L) und Natrimiazid (200mg/L)), <sup>3</sup>*bla*<sub>PMQR</sub>, *mcr* Gene, <sup>4</sup>zweifach vorliegende Kopien von *bla*<sub>OXA-2</sub>, vermutlich Chromosom, <sup>5</sup>na: nicht aufgeklärt, <sup>6</sup>*bla*<sub>CMV2</sub> auf Ind1 und IncK2 Plasmid, AMP Ampicillin, CTX Cefotaxim, CAZ Cefazidim, FOX Cefotaxin, CIP Ciprofloxacin, BE Berlin, BB Brandenburg, BY Bayern, BW Baden-Württemberg, HE Hessen, NI Niedersachsen, MV Mecklenburg-Vorpommern, NW Nordrhein-Westfalen, SN Sachsen, ST Sachsen-Anhalt, TH Thüringen



**Abbildung A-2: Mauve Alignment der drei IncK2 Plasmidvarianten.** Die variable Shufflon-Region ist rot umrandet.



**Abbildung A-3: Minimum spanning tree von *E. coli* ST131 Isolaten dieser Studie und *E. coli* ST131 Genomsequenzen von INSDC und EnteroBase.** Die Phylogenie basiert auf 2 547 Allelen des *ad hoc* cgMLST Schemas. Unterschiede beim *fimH* Allel und der *bla*<sub>CMY</sub> und *bla*<sub>CTX-M</sub> Gene sind farblich markiert. Isolate dieser Studie sind durch rote Ringe markiert.



**Abbildung A-4: Minimum Spanning Tree von 1058 ST10 E coli basierend auf einem cgMLST von EnteroBase (2 513 Loci).** Der Farbcode weist auf die Herkunft der Isolate hin. Mit Erläuterung zum EnteroBase eigenen cgMLST Schema (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>)

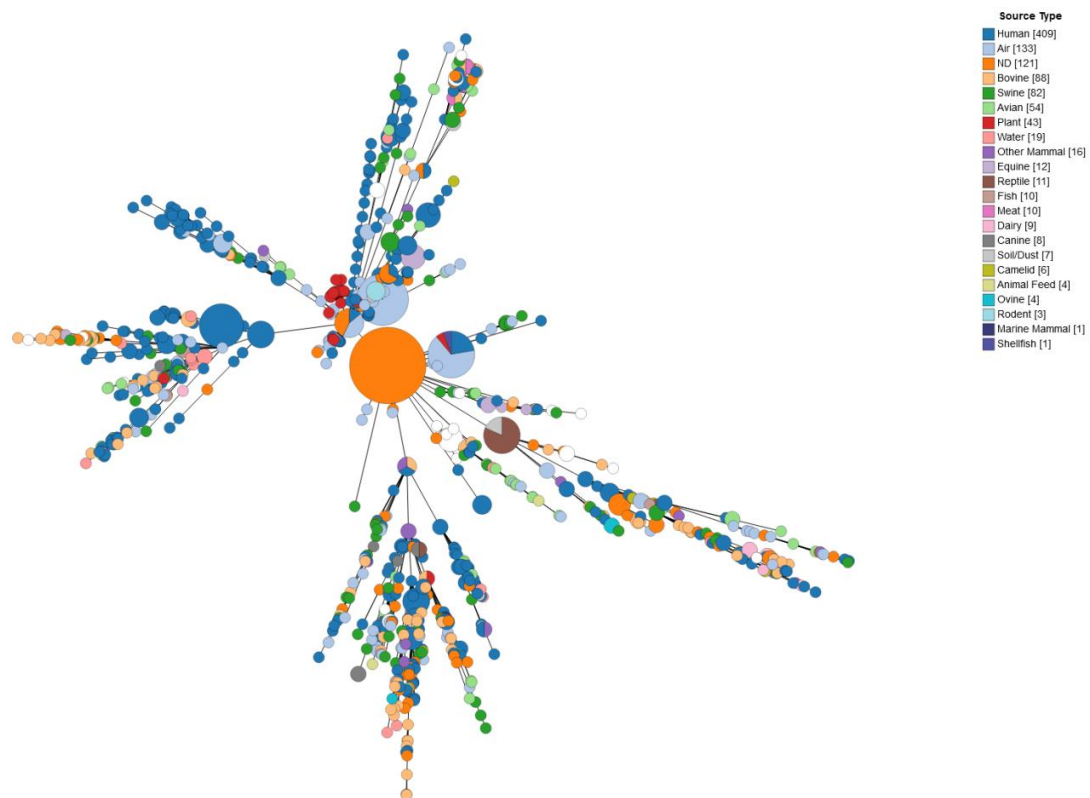
#### Whole genome and Core genome MLST (cgMLST)

Whole genome MLST (wgMLST) and core genome MLST (cgMLST) schemes have been defined in EnteroBase, as a standard typing method for *Escherichia*, for subtler discrimination of genotype as compared to 7 gene MLST and rMLST schemes. Construction of these schemes consisted of three stages. Firstly, coding sequences were compiled from 533 *Escherichia* genomes; including 283 complete genomes in NCBI, 234 NCTC genomes from PacBio sequencing and additional 16 genomes representing cryptic environmental lineages. This encompassed the genomic diversity within the *Escherichia* genus and consisted of a total of 979,077 CDS, which were grouped into 109,529 gene clusters using Uclust. In order to identify homolog regions within each genome, the centroid sequences of each clusters were aligned onto all 533 genomes using nucleotide BLAST, where a gene was considered present if a match covered greater than 70% nucleotide identity over 50% of the length of the centroid sequences.

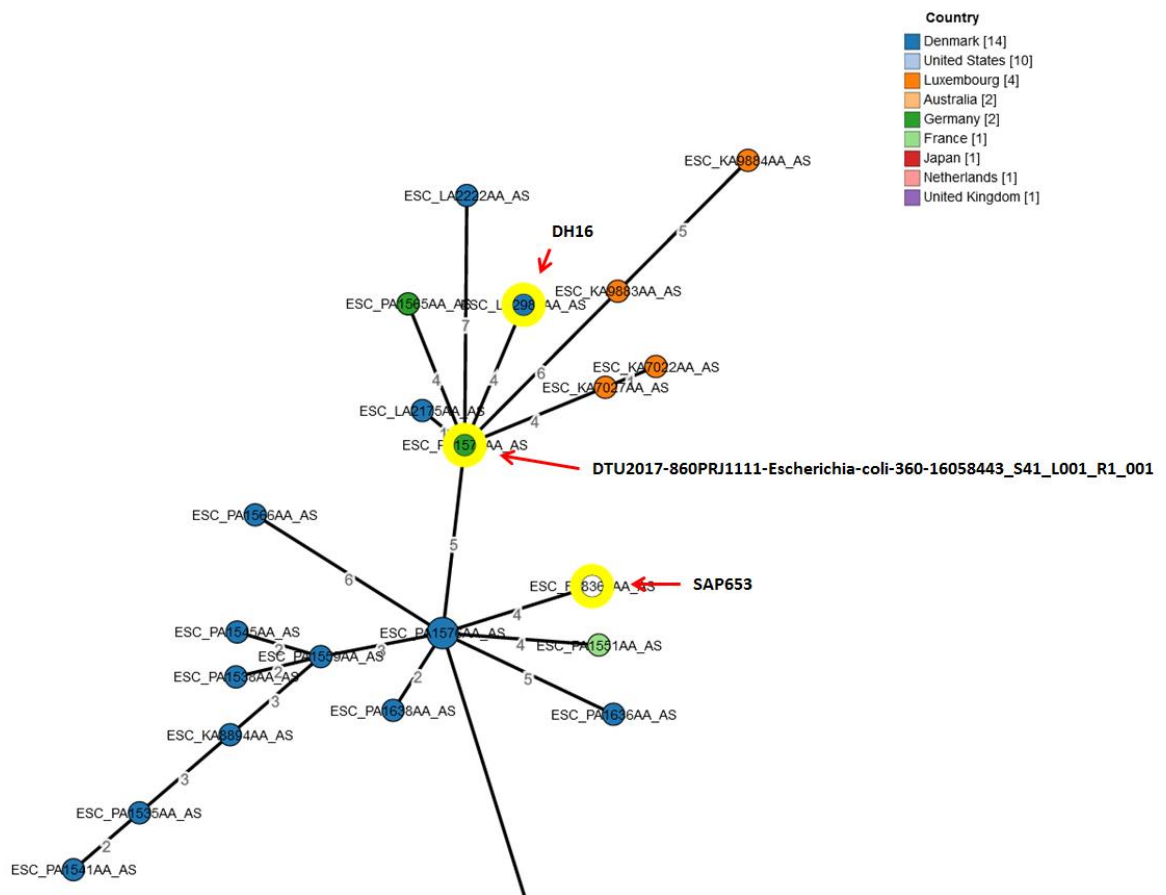
To identify paralogs, the sets of homologous regions with potential paralogs were identified if there were at duplicate matched within any single genome. These regions were iteratively sub-clustered based on phylogenetic topology. Firstly, each set of sets of homologous regions were aligned together. The resulting alignment was used to generate a Maximum likelihood tree using FastTree. The ETE3 package was used to bipartition the tree to maximise the nucleotide diversity (at least 5%) between the subtrees. Each of the resulted subtrees was evaluated iteratively until no two regions came from the same genome in the same subtree, or the maximum inter-subtree diversity was less than 5%. Then we replace the original set of homolog regions with all of its sub-trees.

After the division process, all the homolog sets were scored and ranked according to the summarised alignment scores of their homolog regions. Homolog sets were discarded if they had regions which overlapped with the regions within other sets that had greater scores.

Finally, a complete set of 34,044 pan genes was identified for these 533 genomes. This set was further refined to 25,002 clusters, after similar gene clusters were merged if genes shared over 70% amino acid similarity. From each cluster, a single representative with the greatest alignment score was chosen to create a wgMLST scheme for *Escherichia*. This removed potential non-specific matches to paralogs in the downstream typing procedure. 3,457 *Escherichia* genomes, representing all rMLST STs in EnteroBase (up to May, 2016), were typed using this novel scheme. To generate the cgMLST scheme, a subset of wgMLST loci was selected based on three criteria: 1) The loci presented in over 98% (2,605) of the genomes; 2) The coding frames for the loci were intact in over 94% (3,184) of the genomes; 3) The amount of alleles fell within the majority of all loci. This process yielded a total of 2,513 loci, forming the cgMLST scheme for *Escherichia*.



**Abbildung A-5: Minimum Spanning Tree von 56 ST429 E coli basierend auf einem cgMLST von Enterobase (2 513 Loci)** Das Isolate DTU2017-860PRJ1111 ist in Abbildung 22 integriert.



## ***E. coli ad hoc* cgMLST Schema Parameter**

### **BLAST Options**

Ref-Seq. scan:  
 Word size: 11      Mismatch penalty: -1    Match reward: 1      Gap open costs: 5      Gap extension costs: 2

Matching Thresholds:  
 Required Identity to Ref.-Seq.: 90%      Required Aligned of Ref.-Seq.: 100%

### **cgMLST Target Definer Results**

Date: 22.09.2016 14:17  
 cgMLST Target Definer version: 1.4 (win)  
 Ridom SeqSphere+ version: 3.2.1  
 User: FG13  
 Server: 172.16.64.15 (SeqSphere+ Server on WR-11265)

### **Resulting Targets:**

2547 targets were defined for cgMLST (2485827 bases)  
 2103 targets were used as Accessory targets (1834875 bases)  
 552 targets were discarded

### **Reference Genome:**

\* NC\_002695.1, 5498450 bases, 5202 genes (Escherichia coli O157:H7 str. Sakai chromosome, complete genome.)

**Tabelle A-3: Query Genomes des *E. coli ad hoc* cgMLST Schemas**

### **Query Genomes (43):**

\* NC\_017626.1, 5241977 bases, 5088 genes (Escherichia coli 042 complete genome.)  
 \* NC\_013364.1, 5371077 bases, 5403 genes (Escherichia coli O111:H- str. 11128 DNA, complete genome.)  
 \* NC\_013361.1, 5697240 bases, 5775 genes (Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome.)  
 \* NC\_013353.1, 5449314 bases, 5453 genes (Escherichia coli O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome.)  
 \* NZ\_CP009166.1, 4948797 bases, 4727 genes (Escherichia coli 1303, complete genome.)  
 \* NC\_018650.1, 5253138 bases, 5154 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2050, complete genome.)  
 \* NC\_018661.1, 5312586 bases, 5229 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2071, complete genome.)  
 \* NC\_018658.1, 5273097 bases, 4963 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2011C-3493 chromosome, complete genome.)  
 \* NC\_008253.1, 4938920 bases, 4688 genes (Escherichia coli 536, complete genome.)  
 \* NC\_011748.1, 5154862 bases, 5025 genes (Escherichia coli 55989 chromosome, complete genome.)  
 \* NC\_017631.1, 5131397 bases, 4937 genes (Escherichia coli ABU 83972, complete genome.)  
 \* NZ\_CP007442.1, 4936576 bases, 4761 genes (Escherichia coli ACN001, complete genome.)  
 \* NZ\_CP005930.1, 4929051 bases, 4823 genes (Escherichia coli APEC IMT5155, complete genome.)  
 \* NC\_008563.1, 5082025 bases, 4990 genes (Escherichia coli APEC O1, complete genome.)  
 \* NC\_020163.1, 4798435 bases, 4668 genes (Escherichia coli APEC O78, complete genome.)  
 \* NZ\_CP009072.1, 5130767 bases, 4939 genes (Escherichia coli ATCC 25922, complete genome.)  
 \* NC\_010468.1, 4746218 bases, 4513 genes (Escherichia coli ATCC 8739, complete genome.)  
 \* NZ\_CP014269.1, 4569185 bases, 4431 genes (Escherichia coli B strain C3029, complete genome.)  
 \* NZ\_CP014268.2, 4478958 bases, 4307 genes (Escherichia coli B strain C2566, complete genome.)  
 \* CP005998.1, 4944397 bases, 5031 genes (Escherichia coli B7A, complete genome.)  
 \* NC\_012892.2, 4558947 bases, 4387 genes (Escherichia coli BL21(DE3), complete genome.)  
 \* NC\_012971.2, 4558953 bases, 4387 genes (Escherichia coli BL21(DE3), complete genome.)  
 \* NC\_012947.1, 4570938 bases, 4418 genes (Escherichia coli 'BL21-Gold(DE3)pLysS AG', complete genome.)  
 \* NZ\_CP009273.1, 4631469 bases, 4466 genes (Escherichia coli BW25113, complete genome.)  
 \* NC\_012759.1, 4578159 bases, 4429 genes (Escherichia coli BW2952, complete genome.)  
 \* NZ\_CP011331.1, 5292862 bases, 5198 genes (Escherichia coli O104:H4 str. C227-11, complete genome.)  
 \* NC\_013941.1, 5386352 bases, 5284 genes (Escherichia coli O55:H7 str. CB9615, complete genome.)  
 \* NC\_017646.1, 5313531 bases, 5232 genes (Escherichia coli O7:K1 str. CE10, complete genome.)  
 \* NC\_004431.1, 5231428 bases, 5058 genes (Escherichia coli CFT073, complete genome.)  
 \* NC\_017625.1, 4630707 bases, 4447 genes (Escherichia coli DH1, complete genome.)  
 \* NC\_017638.1, 4621430 bases, 4438 genes (Escherichia coli DH1 (ME8569) DNA, complete genome.)  
 \* NC\_011601.1, 4965553 bases, 4939 genes (Escherichia coli 0127:H6 E2348/69 complete genome, strain E2348/69.)  
 \* NC\_009801.1, 4979619 bases, 4833 genes (Escherichia coli E24377A, complete genome.)  
 \* NC\_011353.1, 5572075 bases, 5608 genes (Escherichia coli O157:H7 str. EC4115, complete genome.)  
 \* NZ\_CP010344.1, 4803751 bases, 4616 genes (Escherichia coli ECC-1470, complete genome.)  
 \* NZ\_CP008957.1, 5547323 bases, 5547 genes (Escherichia coli O157:H7 str. EDL933, complete genome.)  
 \* NZ\_CP009644.1, 4558663 bases, 4396 genes (Escherichia coli ER2796, complete genome.)  
 \* NC\_017633.1, 5153435 bases, 5066 genes (Escherichia coli ETEC H10407, complete genome.)  
 \* NC\_009800.1, 4643538 bases, 4453 genes (Escherichia coli HS, complete genome.)  
 \* NC\_011750.1, 5132068 bases, 4725 genes (Escherichia coli IA139 chromosome, complete genome.)  
 \* NZ\_CP009789.1, 4558660 bases, 4396 genes (Escherichia coli K-12 strain ER3413, complete genome.)  
 \* NZ\_CP010438.1, 4619729 bases, 4459 genes (Escherichia coli K-12 strain ER3454, complete genome.)

\* NZ\_LN832404.1, 4638126 bases, 4470 genes (Escherichia coli K-12 genome assembly EcoliK12AG100, chromosome : I.)

#### Reference Genome Filters:

- \* Minimum Length Filter
- \* Start Codon Filter
- \* Stop Codon Filter
- \* Homologous Gene Filter
- \* Gene Overlap Filter
- \* Excluded Sequences Filter

#### Query Genomes Filters:

- \* Stop Codon Percentage Filter

BLAST version 2.2.12

CITATION: Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.

#### Query Genome BLAST Search Settings:

- \* Identity %: 90.0
- \* Aligned %: 100.0
- \* Word size: 11
- \* Mismatch penalty: -1
- \* Match reward: 1
- \* Gap open costs: 5
- \* Gap extension costs: 2

#### Progress:

- \* cgMLST target search start at 22.09.2016 14:13
- \* 5202 genes found in reference genome NC\_002695.1, 5498450 bases, 5202 genes (Escherichia coli O157:H7 str. Sakai chromosome, complete genome.).
- \* 4332 targets after filtering reference genome NC\_002695.1, 5498450 bases, 5202 genes (Escherichia coli O157:H7 str. Sakai chromosome, complete genome.).
- \* 3492 targets after blasting against NC\_017626.1, 5241977 bases, 5088 genes (Escherichia coli 042 complete genome.)
- \* 3265 targets after blasting against NC\_013364.1, 5371077 bases, 5403 genes (Escherichia coli O111:H- str. 11128 DNA, complete genome.)
- \* 3239 targets after blasting against NC\_013361.1, 5697240 bases, 5775 genes (Escherichia coli O26:H11 str. 11368 DNA, complete genome.)
- \* 3208 targets after blasting against NC\_013353.1, 5449314 bases, 5453 genes (Escherichia coli O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome.)
- \* 3162 targets after blasting against NZ\_CP009166.1, 4948797 bases, 4727 genes (Escherichia coli 1303, complete genome.)
- \* 3141 targets after blasting against NC\_018650.1, 5253138 bases, 5154 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2050, complete genome.)
- \* 3139 targets after blasting against NC\_018661.1, 5312586 bases, 5229 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2071, complete genome.)
- \* 3138 targets after blasting against NC\_018658.1, 5273097 bases, 4963 genes (Escherichia coli O104:H4 str. 2011C-3493 chromosome, complete genome.)
- \* 2970 targets after blasting against NC\_008253.1, 4938920 bases, 4688 genes (Escherichia coli 536, complete genome.)
- \* 2961 targets after blasting against NC\_011748.1, 5154862 bases, 5025 genes (Escherichia coli 55989 chromosome, complete genome.)
- \* 2944 targets after blasting against NC\_017631.1, 5131397 bases, 4937 genes (Escherichia coli ABU 83972, complete genome.)
- \* 2937 targets after blasting against NZ\_CP007442.1, 4936576 bases, 4761 genes (Escherichia coli ACN001, complete genome.)
- \* 2920 targets after blasting against NZ\_CP005930.1, 4929051 bases, 4823 genes (Escherichia coli APEC IMT5155, complete genome.)
- \* 2919 targets after blasting against NC\_008563.1, 5082025 bases, 4990 genes (Escherichia coli APEC O1, complete genome.)
- \* 2918 targets after blasting against NC\_020163.1, 4798435 bases, 4668 genes (Escherichia coli APEC O78, complete genome.)
- \* 2918 targets after blasting against NZ\_CP009072.1, 5130767 bases, 4939 genes (Escherichia coli ATCC 25922, complete genome.)
- \* 2905 targets after blasting against NC\_010468.1, 4746218 bases, 4513 genes (Escherichia coli ATCC 8739, complete genome.)
- \* 2827 targets after blasting against NZ\_CP014269.1, 4569185 bases, 4431 genes (Escherichia coli B strain C3029, complete genome.)
- \* 2827 targets after blasting against NZ\_CP014268.2, 4478958 bases, 4307 genes (Escherichia coli B strain C2566, complete genome.)
- \* 2811 targets after blasting against CP005998.1, 4944397 bases, 5031 genes (Escherichia coli B7A, complete genome.)
- \* 2811 targets after blasting against NC\_012892.2, 4558947 bases, 4387 genes (Escherichia coli BL21(DE3), complete genome.)
- \* 2811 targets after blasting against NC\_012971.2, 4558953 bases, 4387 genes (Escherichia coli BL21(DE3), complete genome.)
- \* 2807 targets after blasting against NC\_012947.1, 4570938 bases, 4418 genes (Escherichia coli 'BL21-Gold(DE3)pLysS AG', complete genome.)
- \* 2800 targets after blasting against NZ\_CP009273.1, 4631469 bases, 4466 genes (Escherichia coli BW25113, complete genome.)
- \* 2759 targets after blasting against NC\_012759.1, 4578159 bases, 4429 genes (Escherichia coli BW2952, complete genome.)
- \* 2747 targets after blasting against NZ\_CP011331.1, 5292862 bases, 5198 genes (Escherichia coli O104:H4 str. C227-11, complete genome.)
- \* 2745 targets after blasting against NC\_013941.1, 5386352 bases, 5284 genes (Escherichia coli O55:H7 str. CB9615, complete genome.)
- \* 2725 targets after blasting against NC\_017646.1, 5313531 bases, 5232 genes (Escherichia coli O7:K1 str. CE10, complete genome.)
- \* 2725 targets after blasting against NC\_004431.1, 5231428 bases, 5058 genes (Escherichia coli CFT073, complete genome.)
- \* 2725 targets after blasting against NC\_017625.1, 4630707 bases, 4447 genes (Escherichia coli DH1, complete genome.)
- \* 2710 targets after blasting against NC\_017638.1, 4621430 bases, 4438 genes (Escherichia coli DH1 (ME8569) DNA, complete genome.)
- \* 2690 targets after blasting against NC\_011601.1, 4965553 bases, 4939 genes (Escherichia coli O127:H6 E2348/69 complete genome, strain E2348/69.)
- \* 2685 targets after blasting against NC\_009801.1, 4979619 bases, 4833 genes (Escherichia coli E24377A, complete genome.)
- \* 2677 targets after blasting against NC\_011353.1, 5572075 bases, 5608 genes (Escherichia coli O157:H7 str. EC4115, complete genome.)
- \* 2677 targets after blasting against NZ\_CP010344.1, 4803751 bases, 4616 genes (Escherichia coli ECC-1470, complete genome.)
- \* 2677 targets after blasting against NZ\_CP008957.1, 5547323 bases, 5547 genes (Escherichia coli O157:H7 str. EDL933, complete genome.)
- \* 2659 targets after blasting against NZ\_CP009644.1, 4558663 bases, 4396 genes (Escherichia coli ER2796, complete genome.)

- \* 2655 targets after blasting against NC\_017633.1, 5153435 bases, 5066 genes (Escherichia coli ETEC H10407, complete genome.)
- \* 2638 targets after blasting against NC\_009800.1, 4643538 bases, 4453 genes (Escherichia coli HS, complete genome.)
- \* 2582 targets after blasting against NC\_011750.1, 5132068 bases, 4725 genes (Escherichia coli IAI39 chromosome, complete genome.)
- \* 2582 targets after blasting against NZ\_CP009789.1, 4558660 bases, 4396 genes (Escherichia coli K-12 strain ER3413, complete genome.)
- \* 2581 targets after blasting against NZ\_CP010438.1, 4619729 bases, 4459 genes (Escherichia coli K-12 strain ER3454, complete genome.)
- \* 2575 targets after blasting against NZ\_LN832404.1, 4638126 bases, 4470 genes (Escherichia coli K-12 genome assembly EcoliK12AG100, chromosome : L)
- \* cgMLST target search ended at 22.09.2016 14:17

### **cgMLST Genome Coverage:**

**\* 45.2% of Reference genome (NC\_002695.1, 5498450 bases, 5202 genes (Escherichia coli O157:H7 str. Sakai chromosome, complete genome.)) bases covered by cgMLST targets**

- \* 47.4% of Query genome (NC\_017626.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 46.3% of Query genome (NC\_013364.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 43.6% of Query genome (NC\_013361.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 45.6% of Query genome (NC\_013353.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.2% of Query genome (NZ\_CP009166.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 47.3% of Query genome (NC\_018650.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 46.8% of Query genome (NC\_018661.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 47.1% of Query genome (NC\_018658.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.3% of Query genome (NC\_008253.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.2% of Query genome (NC\_011748.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.4% of Query genome (NC\_017631.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.4% of Query genome (NZ\_CP007442.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.4% of Query genome (NZ\_CP005930.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.9% of Query genome (NC\_008563.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 51.8% of Query genome (NC\_020163.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.4% of Query genome (NZ\_CP009072.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 52.4% of Query genome (NC\_010468.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.4% of Query genome (NZ\_CP014269.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 55.5% of Query genome (NZ\_CP014268.2) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.3% of Query genome (CP005998.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.5% of Query genome (NC\_012892.2) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.5% of Query genome (NC\_012971.2) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.4% of Query genome (NC\_012947.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.7% of Query genome (NZ\_CP009273.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.3% of Query genome (NC\_012759.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 47.0% of Query genome (NZ\_CP011331.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 46.2% of Query genome (NC\_013941.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 46.8% of Query genome (NC\_017646.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 47.5% of Query genome (NC\_004431.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.7% of Query genome (NC\_017625.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.8% of Query genome (NC\_017638.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 50.1% of Query genome (NC\_011601.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 49.9% of Query genome (NC\_009801.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 44.6% of Query genome (NC\_011353.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 51.7% of Query genome (NZ\_CP010344.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 44.8% of Query genome (NZ\_CP008957.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.5% of Query genome (NZ\_CP009644.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.2% of Query genome (NC\_017633.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.5% of Query genome (NC\_009800.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 48.4% of Query genome (NC\_011750.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 54.5% of Query genome (NZ\_CP009789.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.8% of Query genome (NZ\_CP010438.1) bases covered by cgMLST targets
- \* 53.6% of Query genome (NZ\_LN832404.1) bases covered by cgMLST targets

### **Targets Discarded by Reference Genome Filter:**

- \* Stop Codon Filter: 4
- \* Homologous Gene Filter: 548

## Parameter der *ad hoc* Kerngenomanalyse von IncK2 Plasmiden

### BLAST Options

Ref-Seq. scan:

Word size: 11

Mismatch penalty: -1 Match reward: 1

Gap open costs: 5

Gap extension costs: 2

Matching Thresholds:

Required Identity to Ref.-Seq.: 90%

Required Aligned of Ref.-Seq.: 99%

Reference genome: KR905386.1

**Tabelle A-4: Mittels cgMLST Target Definer (v.1.4) identifizierte ORFs von KR905386.1**

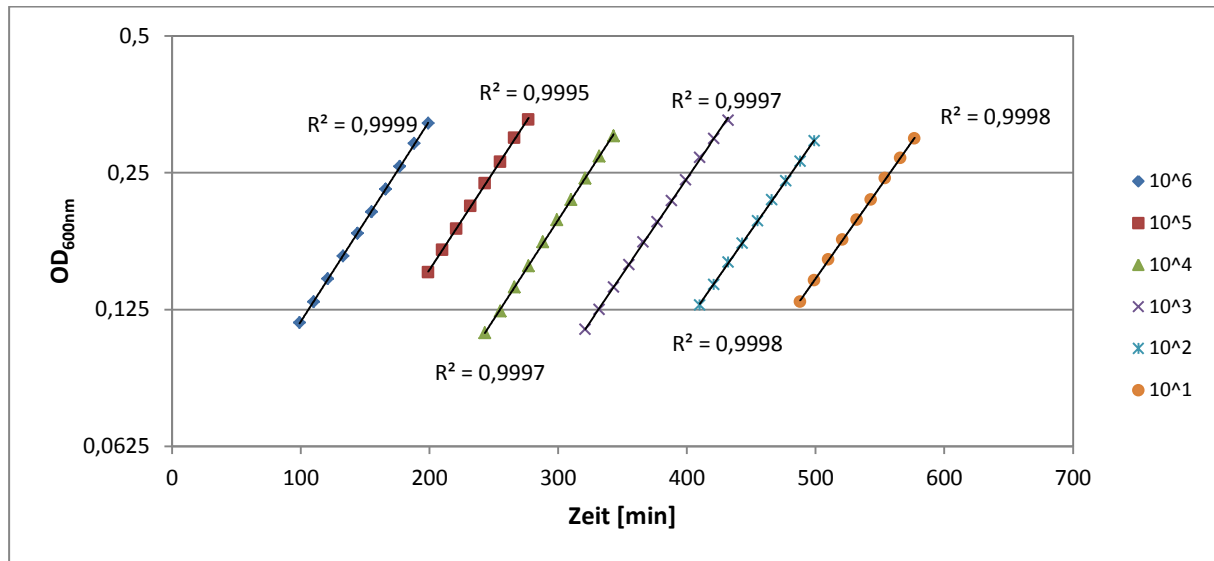
Target	Gene	Note	Product	Abs. Offset	Ref.-seq len.
TraB	repA4	conjugative transfer protein	TraB	0	79297
RepA1		replication initiation protein	RepA1	694	864
TraC		partial	TraC	2127	171
RelB		antitoxin for toxin-antitoxin plasmid stability mechanism	RelB	2513	252
RelE	proP	toxin for toxin-antitoxin plasmid stability mechanism	RelE	2761	288
WcaB		Colanic acid biosynthesis acetyltransferase	WcaB	3152	591
TraC_1		partial	TraC	3800	654
ParA		conjugative transfer protein	ParA	4953	627
ImpB		conjugative transfer protein	ImpB	5767	1272
ImpA		conjugative transfer protein	ImpA	7038	438
ImpC		conjugative transfer protein	ImpC	7472	249
hypothetical protein		conjugative transfer protein	hypothetical protein	7825	207
YfbA		hypothetical protein	YfbA	8021	312
YfaB		hypothetical protein	YfaB	8418	726
hypothetical protein_1		conjugative transfer protein	hypothetical protein	9127	1239
PsiB		plasmid SOS inhibition protein	PsiB	10420	435
PsiA		plasmid SOS inhibition protein A	PsiA	10851	720
YgaA		hypothetical protein	YgaA	11567	597
ArdA		antirestriction protein	ArdA	12628	501
YgcA		hypothetical protein	YgcA	13857	435
YgdA		hypothetical protein	YgdA	14383	267
YhgA		hypothetical protein	YhgA	14714	918
YgeA		hypothetical protein	YgeA	15882	252
YgfA		hypothetical protein	YgfA	16265	324
YgfB		hypothetical protein	YgfB	16713	849
YggA		hypothetical protein	YggA	17647	336
NikA		conjugative transfer protein	NikA	18215	333
NikB		conjugative transfer protein	NikB	18559	2721
TrbC		conjugative transfer protein	TrbC	21500	2301
TrbB		protein-disulfide isomerase	TrbB	23781	1119
TrbA		conjugative transfer protein	TrbA	24896	1344
hypothetical protein_2		conjugative transfer protein	hypothetical protein	26696	177
ParB		endonuclease	ParB	27023	468
DNA-binding protein		conjugative transfer protein	DNA-binding protein	27593	681
hypothetical protein_3		conjugative transfer protein	hypothetical protein	28690	384
PndC		plasmid stability protein	PndC	29780	294
PndA		conjugative transfer protein	PndA	29928	153
ExcA		surface exclusion protein	ExcA	30894	654
TraY		conjugative transfer integral membrane protein	TraY	31635	2166
TraX		conjugal transfer protein	TraX	33873	570
TraW		conjugative transfer protein	TraW	34439	1206
TraV		conjugal transfer protein	TraV	35605	618
TraU		conjugal transfer protein	TraU	36222	3045
hypothetical protein_4		conjugative transfer protein	hypothetical protein	39442	384
hypothetical protein_5		conjugative transfer protein	hypothetical protein	39822	309
SugE		conjugative transfer protein	SugE	40326	318

Target	Gene	Note	Product	Abs. Offset	Ref.-seq len.
Blc		outer membrane lipoprotein	Blc	40640	534
blaCMY-2		Beta-lactamase	blaCMY-2	41267	1146
ISEcp1		Transposase	ISEcp1	42736	1263
TraT		conjugative transfer protein	TraT	44335	819
TraS		conjugal transfer protein	TraS	45068	252
TraR		conjugal transfer protein	TraR	45376	399
TraQ		conjugal transfer protein	TraQ	45821	531
TraP		conjugative transfer protein	TraP	46348	714
TraO		conjugal transfer protein	TraO	47058	1332
TraN		conjugal transfer protein	TraN	48393	975
TraM		conjugal transfer protein	TraM	49378	696
TraL		conjugative transfer protein	TraL	50085	351
DNA primase		conjugative transfer protein	DNA primase	50452	4062
TraK		conjugative transfer protein	TraK	54577	291
TraJ		plasmid transfer ATPase	TraJ	54864	1149
TraI		plasmid conjugative transfer protein	TraI	55996	837
TraH		conjugative transfer protein	TraH	56829	453
TraF		conjugal transfer protein	TraF	57640	1203
TraE		conjugal transfer protein	TraE	58932	822
TraD		conjugal transfer protein	TraD	60004	546
hypothetical protein_6		conjugative transfer protein	hypothetical protein	60668	282
Rci		DNA recombinase	Rci	60990	1170
Shufflon protein D		conjugative transfer protein	Shufflon protein D	62545	465
shufflon protein D'		conjugative transfer protein	shufflon protein D'	63184	390
TraC_2	shufflon protein B	partial	TraC	63583	162
Shufflon protein B		conjugative transfer protein	Shufflon protein B	63659	588
Shufflon protein B_1		conjugative transfer protein	Shufflon protein B	64251	1296
TrkB		potassium transporter	TrkB	65582	708
PilT		conjugative transfer protein	PilT	66249	477
PilS		major pilin subunit proteinmajor pilin subunit protein	PilS	66784	537
type IV pilus integral inner membrane protein		conjugative transfer protein	type IV pilus integral inner membrane protein	67371	1101
PilQ		Type IV pilus (ATPase)	PilQ	68473	1509
hypothetical protein_7		conjugative transfer protein	hypothetical protein	70078	597
hypothetical protein_8		conjugative transfer protein	hypothetical protein	70770	555
PilP		type IV pilus biogenesis protein	PilP	71373	453
PilO		pilus assembly protein	PilO	71815	1296
PilN		type IVB pilus formation outer membrane protein	PilN	73131	1620
PilM		pilin inner membrane protein	PilM	74781	438
pilus assembly protein		conjugative transfer protein	pilus assembly protein	75223	1071
hypothetical protein_9		conjugative transfer protein	hypothetical protein	76415	396
hypothetical protein_10		conjugative transfer protein	hypothetical protein	76811	432
PilI		pilus assembly protein	PilI	77315	453
TraC_3		conjugative transfer protein	TraC	77834	666



## Anhang III: Fitness Studie

**Abbildung A-6:** Überprüfung der ermittelten exponentiellen Phase von *E. coli* K12 J53. bei definiertem Treshold von  $\mu \geq 0,5$  für das exponentielles Wachstum.



**Tabelle A-5:** Verwendete Isolate und zugehörige Transkonjuganten der Fitness Studie

Isolat	Trans-konjugant <sup>1,2</sup>	Spezies	Isolations-jahr	MLST/Phylo-Gruppe <sup>3</sup>	<i>bla</i> -Resistenzgene	<i>bla</i> Plasmid [kb] <sup>4</sup>	Replikon-typ <sup>5</sup>
102/04		<i>E. coli</i>	2004	D	<i>bla</i> <sub>CMY-16</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	160	
	102/04 K1	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>CMY-16</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	160	IncA/C
	102/04 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>CMY-16</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	160	IncA/C
151/09		<i>E. cloacae</i>	2009		<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	100	
	151/09 K2	<i>E. coli</i>		A		100	IncN/IncR
17/11		<i>E. coli</i>	2011	B1	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	210, 190, 85, 65	
	17/11 K1	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	190	IncA/C
252/09		<i>E. coli</i>	2009		<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	85, 60, 30	IncI1, IncFI
	252/09 K3	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	85, 60	IncI1, IncFII
346/12		<i>K. pneumoniae</i>	2012		<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	105, 60, 35	IncL/M-1
	346/12 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	60	IncL/M-1
370/12		<i>K. oxytoca</i>	2012		<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	250, 150, 100	IncFIB, IncL/M-1
	370/12 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	250	IncFIB
371/12	negativ	<i>E. coli</i>	2012		<i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA</sub>		
384/13		<i>K. pneumoniae</i>	2013		<i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48-tyr</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	240, 110	IncFII, IncI1, IncN?
	384/13 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	110	IncFII
467/13		<i>K. pneumoniae</i>			<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	60	IncL/M-1
	467/13 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	60	
531/12		<i>E. coli</i>			<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	190, 90, 55	IncI1
	531/12 K2	<i>E. coli</i>		A		90	IncI1
656/13		<i>E. coli</i>			<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	140, 105	
	656/13 K2	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	105	IncI1
RS014	negativ	<i>E. coli</i>	2010	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		

Isolat	Trans-konjugant <sup>1,2</sup>	Spezies	Isolations-jahr	MLST/Phylo-Gruppe <sup>3</sup>	bla-Resistenzgene	bla Plasmid [kb] <sup>4</sup>	Replikon-typ <sup>5</sup>
RS039		<i>E. coli</i>	2011	ST46	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	80	Incl1
	RS039 K1	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>		Incl1
RS060	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>		
RS135	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST410	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS081	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>E. coli</i>	2011	D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	90	Incl1
RS165		<i>E. coli</i>	2011	ST73	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>		
	RS165 K1				<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>		IncFII
RS292		<i>E. coli</i>	2012	D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-</sub>		IncFII
	RS292 K1	<i>E. coli</i>		A	<sup>1</sup> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-</sub>		IncFII
104/15		<i>E. coli</i>	2015	B2, rfbO25 negativ	<sup>1</sup> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	77	IncF
	104/15 K3	<i>E. coli</i>		A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	77	IncFII
<b>ST131-<i>E. coli</i> mit <i>bla</i><sub>CTX-M-15</sub></b>							
RS013	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2010	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS014	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2010	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS025	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS029	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS031	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS050	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS062	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS071	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS072	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS080	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS090	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS093	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS098	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> Plasmid	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS099	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS103	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS104	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS106	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS107	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS113	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS115	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS127	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS134	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS137	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS143	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> Plasmid	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-</sub>		
RS144	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , aber 2 Plasmide transferiert	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<sup>1</sup> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS147	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , aber 2 Plasmide transferiert	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS176	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , aber 2 Plasmide transferiert	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
RS184	<i>negativ</i>	<i>E. coli</i>	2011	ST131	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		

<sup>1</sup>*E. coli* K12 J53, <sup>2</sup>falls erfolgreich konjugiert, andernfalls *negativ*, <sup>3</sup>*E. coli*, <sup>4</sup>mittels S1-Nuklease PFGE ermittelt, <sup>5</sup>mittels PRBT bestimmt

Tabelle A-6: MHK der Transkonjuganten verschiedener Generationen der Fitness Studie

Isolat	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	FOX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	MEP	SXT
<b>102/04 K1</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	> 32	> 32	1	> 32	> 32	> 64	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -1</b>	> 16	32	≤ 2	> 8	16	32	> 32	≤ 0,5	> 32	16	64	8	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -2</b>	> 16	32	≤ 2	8	8	16	16	≤ 0,5	> 32	8	16	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -5</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	> 32	> 32	4	> 32	> 32	> 64	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -8</b>	> 16	> 32	8	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	32	64	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -1</b>	> 16	16	≤ 2	> 8	8	16	16	≤ 0,5	> 32	4	16	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -2</b>	> 16	32	4	> 8	16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	8	16	8	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -3</b>	> 16	16	≤ 2	8	8	16	32	≤ 0,5	> 32	8	16	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -4</b>	> 16	16	≤ 2	8	8	32	> 32	≤ 0,5	> 32	8	64	16	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>102/04 K2</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	8	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	16	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -5</b>	> 16	32	4	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G200 -8</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -1</b>	> 16	16	< 2	> 8	4	4	32	≤ 0,5	> 32	4	8	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -2</b>	> 16	16	8	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -3</b>	> 16	32	4	> 8	> 16	> 32	> 32	≤ 0,5	> 32	> 32	> 64	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>G500 -4</b>	> 16	16	< 2	> 8	16	32	> 32	≤ 0,5	> 32	16	32	< 4	> 32	> 8	≤ 0,063	≤ 0,063	> 128
<b>252/09 K3</b>	> 16	> 32	8	> 8	16	> 32	> 32	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	8	> 8	16	> 32	> 32	4	4	4	8	16	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	8	> 8	16	> 32	> 32	1	4	4	8	16	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -3</b>	> 16	32	8	> 8	16	32	> 32	1	4	4	≤ 4	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -4</b>	> 16	16	< 2	> 8	4	8	> 32	2	≤ 2	4	8	16	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -1</b>	> 16	< 2	< 2	4	2	8	32	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -2</b>	> 16	4	< 2	8	4	8	16	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -3</b>	> 16	4	< 2	4	2	16	32	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -4</b>	> 16	32	8	> 8	16	> 32	> 32	4	8	4	8	16	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>104/15 K3</b>	> 16	> 32	≤ 2	> 8	> 16	32	16	8	8	4	8	8	> 32	2	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	16	> 8	> 16	32	16	> 8	16	< 2	< 4	16	> 32	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	4	> 8	> 16	32	8	> 8	8	8	8	16	> 32	4	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -3</b>	> 16	> 32	8	> 8	> 16	32	8	> 8	8	4	< 4	16	> 32	2	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -4</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	> 32	32	> 8	8	< 2	< 4	16	> 32	2	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -1</b>	> 16	> 32	4	> 8	> 16	32	16	> 8	4	≤ 2	≤ 4	8	> 32	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -2</b>	> 16	> 32	4	> 8	> 16	> 32	8	> 8	8	4	≤ 4	8	> 32	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -3</b>	> 16	> 32	8	> 8	> 16	32	8	> 8	16	≤ 2	≤ 4	16	> 32	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -4</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	32	8	> 8	8	≤ 2	≤ 4	16	> 32	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>RS165 K1</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	≤ 2	2 - 16	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	8	> 8	16	≤ 2	4	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	4	2	8	≤ 2	8	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -3</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	16	≤ 2	4	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -4</b>	> 16	> 32	32	> 8	16	≤ 2	4	≤ 0,5	≤ 2	≤ 2	≤ 4	16	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -1</b>	> 16	> 32	32	> 8	> 16	< 2	8	≤ 0,5	4	4	< 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -2</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	4	4	≤ 0,5	< 2	< 2	< 4	16	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -3</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	< 2	8	2	4	< 2	8	8	8	1	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G500 -4</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	< 2	8	2	4	4	< 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>151/09 K2</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	4	> 32	> 32	> 64	8	8	1	≤ 0,063	1	> 128
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	1	32	32	> 64	16	8	< 0,5	≤ 0,063	2	> 128
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	4	32	16	> 64	16	8	< 0,5	≤ 0,063	4	> 128
<b>G200 -3</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	8	32	> 32	> 64	16	8	1	≤ 0,063	4	> 128
<b>G200 -4</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	4	32	32	> 64	16	8	1	≤ 0,063	4	> 128
<b>G500 -1</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	1	> 32	4	> 64	8	8	1	≤ 0,063	0,5	> 128
<b>G500 -2</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	> 32	> 32	< 0,5	> 32	4	4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	0,25	> 128
<b>G500 -3</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	32	> 32	< 0,5	> 32	< 2	16	< 4	< 4	< 0,5	≤ 0,063	0,125	> 128
<b>G500 -4</b>	> 16	> 32	> 32	> 8	> 16	32	> 32	1	> 32	16	> 64	16	8	1	≤ 0,063	1	> 128
<b>346/12 K2</b>	> 16	> 32	> 32	4	≤ 1	≤ 2	2 - 16	≤ 0,5	4	≤ 2	8	8	8	1	≤ 0,063	0,25	≤ 4
<b>G200 -1</b>	> 16	> 32	4	1	≤ 1	≤ 2	4	1	≤ 2	≤ 2	≤ 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	≤ 0,063	≤ 4
<b>G200 -2</b>	> 16	> 32	> 32	4	< 1	< 2	8	≤ 0,5	< 2	≤ 2	< 4	8	8	1	≤ 0,063	0,125	≤ 4
<b>G200 -3</b>	> 16	> 32	> 32	4	< 1	< 2	4	≤ 0,5	< 2	≤ 2	< 4	16	8	1	≤ 0,063	0,25	≤ 4

Isolat	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	FOX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	MEP	SXT
<b>G200 -4</b>	> 16	> 32	32	4	< 1	< 2	4	≤ 0,5	2	≤ 2	< 4	16	8	1	≤ 0,063	0,25	≤ 4
<b>G500 -1</b>	> 16	> 32	> 32	2	< 1	< 2	4	≤ 0,5	< 2	≤ 2	< 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	0,25	≤ 4
<b>G500 -2</b>	> 16	> 32	32	4	< 1	< 2	8	≤ 0,5	< 2	≤ 2	< 4	16	8	1	≤ 0,063	0,125	≤ 4
<b>G500 -3</b>	> 16	> 32	> 32	1	< 1	< 2	4	≤ 0,5	< 2	≤ 2	< 4	8	8	< 0,5	≤ 0,063	0,125	< 4
<b>G500 -4</b>	> 16	> 32	> 32	< 0,5	< 1	< 2	8	< 0,5	< 2	< 2	< 4	8	8	1	≤ 0,063	< 0,063	< 4

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit und bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Michael Steinert für die Übernahme des Erstgutachtens und die Begleitung des Promotionsverfahrens als Mentor an der TU Braunschweig.

Prof. Dr. Guido Werner danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Übernahme des Zweitgutachtens, die fortwährende Unterstützung, Rat und vielen Fördermöglichkeiten.

Ein ganz großer Dank geht an Dr. Yvonne Pfeifer für die ausführliche Betreuung, Unterstützung, Zeit und Diskussionsbereitschaft und dafür immer ein offenes Ohr für Probleme und Fragen gehabt zu haben. Vielen Dank für deine Geduld, Zeit und Hilfe!

Dr. Stephan Fuchs möchte ich für die tatkräftige und motivierte Unterstützung in allen Fragestellungen rund um die Bioinformatik und Datenanalyse danken.

Kirstin Ganske und Sibylle Müller-Bertling danke ich für die technische Unterstützung und Hilfe sowie den vielen netten Stunden im Labor.

Ein großes Dankeschön geht an alle Besucher und Bewohner der Doktorandenetage, insbesondere Bernd, Tobi, Robi, Laura, Stefan, Andre, Uli und Stephan. Danke für die konstruktive, witzige und schöne Zeit in Labor, Büro, Freizeit, Harz und auf Reisen. Ihr habt Wernigerode viel größer gemacht.

Den Kollegen vom RKI Wernigerode, insbesondere FG13, danke ich für die warme Aufnahme in Wernigerode, die fachliche und moralische Unterstützung und all die Zeit die wir in Mittags- und Kaffeepausen und bei der Erkundung des Harzes im Sommer wie im Winter verbracht haben.

Abschließend gilt der größte Dank jedoch meiner Familie und insbesondere Ingrid für den Rückhalt und die fortwährende Unterstützung. Ohne euch wäre das erfolgreiche Abschließen dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.